

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1939

THÈSE

N°

457

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

MICHEL FAGUET

Né à Brantôme (Dordogne) le 26 février 1905

L'ANEURINE (VITAMINE B₁)

Méthodes biologiques de titrage.

Étude comparative du test-Pigeon, du test-Rat
et du test-Phycomyces

Président : M. CUNÉO, Professeur

PARIS

SOCIÉTÉ PARISIENNE D'IMPRIMERIE, 27, RUE NICOLAI

1939

LE DOYEN TIFFENEAU.

I. — PROFESSEURS

Anatomie	MM.
Physiologie	ROUVIERE.
Physique médicale	Léon BINET.
Chimie médicale	STROHL.
Bactériologie	POLONOVSKI.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	Robert DEBRE.
Pathologie et thérapeutique générales	BRUMPT.
Pathologie médicale	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale	ABRAMI.
Anatomie pathologique	MONDOR.
Histologie	LEROUX.
Pharmacologie et matière médicale	CHAMPY.
Thérapeutique	TIFFENEAU.
Hygiène et médecine préventive	HARVIER.
Médecine légale	TANON.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	BALTHAZARD.
Pathologie expérimentale et comparée	LAIGNEL LAVASTINE
Hydrologie thérapeutique et climatologie	FIESSINGER.
	CHIRAY.
	LOEPER.
Clinique médicale	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBE.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale ..	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CUNEO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GREGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	CHEVASSU.
	COUVELAIRE.
Clinique d'accouchements	JEANNIN.
	LEVY-SOLAL.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBREDANNE
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	M. VILLARET.
Clinique de la Tuberculose	TROISIER.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
Clinique de cardiologie	LAUBRY.
Clinique de neuro-chirurgie	Clovis VINCENT.
Assistance Médico-sociale	N...
	HAZARD.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire	MULON.
	OLIVIER.
	SANNIE
	VERNE.

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1939

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

MICHEL FAGUET

Né à Brantôme (Dordogne) le 26 février 1905

L'ANEURINE (VITAMINE B₁)

Méthodes biologiques de titrage.

Étude comparative du test-Pigeon, du test-Rat
et du test-Phycomyces

Président : M. CUNÉO, Professeur

PARIS

SOCIÉTÉ PARISIENNE D'IMPRIMERIE, 27, RUE NICOLÒ

1939



A MA MÈRE ET

A MON PÈRE LE Dr ED. FAGUET

*Ancien Assistant titulaire de Médecine Expérimentale à la Faculté de Médecine de Bordeaux,
Ancien Externe des Hôpitaux, Licencié ès-Sciences,
Prix Godard des thèses. Médaille d'Or 1896,
Chevalier de la Légion d'Honneur.*

Qui non seulement m'a donné dès mon jeune âge le goût de la recherche, mais encore m'a toujours permis avec beaucoup de générosité de m'y consacrer.

En très affectueux hommage.

A MON FRÈRE, A MA BELLE-SŒUR

A MA NIÈCE FRANÇOISE

MEIS ET AMICIS

A Monsieur le Professeur CUNÉO

*Professeur de clinique chirurgicale à la Faculté,
Membre de l'Académie de Médecine,
Commandeur de la Légion d'Honneur.*

Qui a bien voulu nous faire l'honneur de
présider cette thèse. Qu'il trouve ici l'hom-
mage de notre reconnaissance pour tout ce
qu'il a fait pour nous et pour avoir bien voulu
nous confier un laboratoire dans son service de
la clinique chirurgicale de l'Hôtel-Dieu.

A la mémoire de mon Maître,
le Professeur CHARLES RICHEL

*Professeur de Physiologie à la Faculté de Médecine,
Membre de l'Académie des Sciences,
Membre de l'Académie de Médecine,
Prix Nobel de Médecine 1913.
Grand officier de la Légion d'Honneur.*

Qui nous fit le très grand honneur de nous
prendre comme collaborateur de 1926 à 1935
et de nous associer à quelques-uns de ses tra-
vaux.

Au maître illustre de la physiologie et de la
médecine dont le nom restera immortellement
attaché à la découverte de l'anaphylaxie (1902)
et des bases de la sérothérapie (1890).

En très fidèle hommage.

A la mémoire du Professeur G. URBAIN

*Professeur de Chimie Générale à la Sorbonne,
Membre de l'Académie des Sciences,
Commandeur de la Légion d'Honneur.*

Qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire de la Sorbonne pendant plusieurs années et qui nous a prodigué ses éminents conseils.

En hommage reconnaissant à sa mémoire.

A Monsieur le Professeur HARTMANN

*Professeur Honoraire à la Faculté de Médecine,
Membre de l'Académie de médecine,
Commandeur de la Légion d'Honneur.*

Qui a bien voulu nous confier en 1934 le soin d'organiser un laboratoire de Physico-Chimie dans le service du Centre Anticancéreux de l'Hôtel-Dieu.

En très respectueux hommage.

A la mémoire du Docteur E. ROUX

*Directeur de l'Institut Pasteur,
Membre de l'Académie des Sciences,
Membre de l'Académie de médecine,
Grand-Croix de la Légion d'Honneur.*

Pour les conseils éminents qu'il a bien voulu
nous donner.

A Monsieur le Professeur agrégé CHARLES RICHET

*Médecin de l'Hôpital Beaujon,
Chevalier de la Légion d'Honneur.*

En très respectueux hommage.

A Monsieur le Docteur ED. LESNÉ

*Membre de l'Académie de Médecine.
Médecin Honoraire des Hôpitaux de Paris,
Officier de la Légion d'Honneur.*

Qui a bien voulu nous ouvrir son laboratoire
de l'Hôpital Trousseau en 1930 et 1931 ; avec
toute notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Docteur BOUCARD

Pour l'amitié qu'il nous a toujours témoigné.

En respectueux hommage.

A la mémoire de Monsieur SCHËN

*Chef du Service des Fermentations à l'Institut Pasteur,
Chevalier de la Légion d'Honneur.*

Qui voulut bien s'intéresser à nos recherches
et nous permettre de collaborer à ses travaux
scientifiques.

A Monsieur le Docteur DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

*Chef de service à l'Institut Pasteur,
Officier de la Légion d'Honneur.*

Pour l'éminent appui scientifique qu'il nous a
toujours accordé.

A la mémoire du Professeur L. CAPITAN

*Membre de l'Académie de Médecine,
Professeur au Collège de France,
Professeur à l'École d'Anthropologie,
Officier de la Légion d'Honneur.*

Qui a bien voulu nous initier aux mystères de
la Préhistoire.

A la mémoire de CAMILLE JULLIAN

*Professeur au Collège de France,
Membre de l'Académie Française,
Membre de l'Académie des Inscript. et Belles-Lettres,
Commandeur de la Légion d'Honneur.*

Dont nous avons été jadis l'élève, en respectueux hommage en sa mémoire.

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX,

WIDAL, P. DUVAL, AUVRAY, LAUBRY, BROUARDEL, LESNÉ,
TERRIEN, CLAUDE, DEVRAIGNE, LEMAITRE, GOUGEROT,
TISSIER, GUILLAIN, LEGUEU

A mon ami le Docteur HENRI LAVERGNE

Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine.

A TOUS MES AMIS DES LABORATOIRES DE LA FACULTÉ
DE MÉDECINE ET DE LA SORBONNE

L'ANEURINE (VITAMINE B₁)

Méthodes biologiques de titrage. Études comparatives des tests rats, pigeons et phycomyces.

I

Introduction

La vitamine B₁ ou vitamine antinévrétique, connue également sous le nom d'aneurine, fait partie du groupe fort complexe des vitamines B. Avant de donner les grandes lignes des découvertes successives qui ont abouti à la découverte de la vitamine B₁, et à sa synthèse au laboratoire, nous donnerons un bref aperçu de ses voisines immédiates, les autres vitamines B. La vitamine B₂ ou lactoflavine est elle-même parfaitement connue et sa synthèse est réalisée facilement à l'heure actuelle. La vitamine B₃ rentre dans la constitution du ferment jaune et nous savons que ce dernier contribue (1) au maintien de conditions favorables aux processus synthétiques dans lesquels il pourrait intervenir suivant le mécanisme décrit par VON EULER. Cette hypothèse serait en parfait accord avec ce que l'on sait du rôle de cette vitamine dans la croissance, à une période où les synthèses sont très actives.

En dehors des vitamines B₁ et B₂ parfaitement définies puisqu'on les reproduit synthétiquement on connaît l'existence de plusieurs autres facteurs B, dont la présence nous est seulement signalée par l'expérimentation physiologique. Nous les citerons brièvement :

- 1° La vitamine B₆, antidermatosique du rat.
- 2° La vitamine P ou antipellagreux de l'homme ou chien.
- 3° La vitamine B₄ ou de croissance du rat.
- 4° La vitamine B₅, ou de croissance du pigeon.
- 5° Le facteur filtrant, élément non adsorbable par la terre à foulon.

Ces différentes vitamines sont encore en cours d'individualisation et leur discussion nous entraînerait fort loin du sujet.

(1) Boulanger P. Conférence à la Soc. Chim. Biol., 5 avril 1938, CR. Soc. Chim. Biol., p. 516, 1938.

La vitamine B₁

A) Isolement et propriétés physiologiques.

Le xix^e siècle et principalement sa deuxième moitié, a été le témoin dans la plupart des branches de la Science de très importantes acquisitions nouvelles. C'est ainsi que les savants désireux depuis longtemps de connaître le nombre et la nature des substances indispensables à la vie, exposèrent vers la fin du siècle dernier les grandes lignes de la doctrine énergétique. Tous les éléments nutritifs furent classés en 4 séries de substances : les matières albuminoïdes, les corps gras, les hydrocarbonnes et les sels minéraux. On estimait alors que ces différentes substances pouvaient être substituées les unes aux autres en tenant compte seulement du nombre de calories produites par la combustion de chacune d'elles. Dès lors on chercha à concentrer ces principes nutritifs en éliminant tout ce qui paraissait inutile. C'est ainsi que l'on élimina les enveloppes, on décortiqua les graines, les légumes etc..., sous prétexte d'enlever des substances sans intérêt et moins digestibles. Or, il arriva que les régimes que l'on avait ainsi établis, régimes qui eussent dû être parfaits, ne convenaient point à l'entretien normal de la vie. L'application de ces régimes détermina des troubles graves dus à la carence de certains éléments inconnus, qui en agissant à dose infinitésimale commandaient la nutrition toute entière. Ces troubles avaient donc pour caractéristique d'apparaître, non à la suite de l'absorption de substances toxiques, mais par suite de la carence d'éléments indispensables à la vie. Ce sont ces substances que l'on appella *vitamines*.

Leur connaissance a donc bénéficié de deux catégories de chercheurs. Les premiers, les savants de laboratoire qui établirent les données énergétiques de l'alimentation, les seconds, les médecins qui se penchèrent sur le problème de graves maladies comme le scorbut et béri-béri, maladies qui décimaient d'immenses territoires.

C'est du rapprochement de ces deux séries de recherches que naquit le fécond domaine des vitamines. Nous sortirions longuement de notre sujet si nous donnions l'historique de la découverte de chacune d'elles. Leur nombre déjà grand, s'accroît sans cesse. Parmi elles, plusieurs sont parfaitement connues, comme l'aneurine (vitamine B₁) la lactoflavine (vitamine B₂), l'acide ascorbique (vitamine C), l'ergostérol (vitamine D), etc. Certaines comme les vitamines B₁, B₂, C, ont une formule parfaitement établie et leur synthèse a pu même être réalisée par des voies différentes.

Nous ne nous occuperons que de la vitamine B₁ à laquelle les principaux auteurs ont donné le nom d'*aneurine*.

Vers 1880 le béribéri inquiéta le gouvernement des Indes Néerlandaises. On remarqua que dans certaines prisons, un séjour de plus de trois mois équivalait à une condamnation à mort, car les détenus contractaient le béribéri et en mouraient..

De même, la guerre d'Atjeb devint très difficile à poursuivre parce que les soldats de la garnison de Kotta-Radja étaient atteints du béribéri après 2 ou 3 mois. Ces phénomènes incitèrent le gouvernement hollandais à envoyer sur place une commission qui étudierait la genèse de cette maladie. Ce furent les Docteurs Pekelharing et Winkler qui furent désignés comme les chefs de cette expédition. Ces derniers partirent avec des idées préconçues. Ils pensaient à deux causes possibles de la maladie : une cause microbienne, ou une intoxication. Pekelharing découvrit un *coccus* qui d'après lui devait être la cause du béribéri. Dès lors on donna comme mesure de prophylaxie des ordres de désinfection. La Commission regagna la Hollande, mais on autorisa l'un de ses membres un jeune médecin hollandais Eijkmann à continuer ces recherches. Il s'embarqua donc et se livra à de multiples essais en utilisant la poule comme animal d'expériences; ses tentatives d'inoculer la maladie avec du sang, de l'urine de malade atteint de béribéri échoua. Cependant, par la suite, tous les animaux tombèrent malades du béribéri, animaux témoins compris. Quelque temps après les animaux se rétablirent et Eijkmann, examinant le régime dont ils avaient bénéficié, fut amené aux conclusions suivantes : les poules avaient présenté les symptômes du béribéri lorsque le riz brut avait été remplacé par du riz glacé. Ces symptômes avaient regressé dès que le riz glacé avait été de nou-

veau remplacé par du riz brut. Eijkmann fit de nombreuses vérifications et conclut que la cause du béribéri chez les poules provenait bien de la consommation de riz glacé. Secondé par son ami, le Docteur Voderman inspecteur sanitaire, ils montrèrent que le béribéri constaté chez les prisonniers avait lui aussi son origine dans l'utilisation du riz glacé. La solution du problème était trouvée.

Ces expériences furent continuées à Batavia par Jansen qui rechercha les animaux les plus sensibles à cette carence. Il trouva que le bondol, capucin à tête blanche, était d'une très grande sensibilité. Dix jours d'un régime carencé suffisaient à faire apparaître le béribéri. En outre Jansen utilisant le principe de l'adsorption sur terre à foulon de cette vitamine, principe énoncé déjà par Seidell en Amérique, parvint à concentrer cette substance et à en préparer en collaboration avec le Docteur Donath une quantité d'environ 120 mg. cristallisé.

Dès lors la vitamine B₁ isolée, non encore identifiée, devint l'objet d'un nombre très grand de recherche chimiques et physiologiques ; on savait que le béribéri cause une dégénérescence des nerfs périphériques. Aussi Gryn's considère que la vitamine B₁ est indispensable à la constitution de la substance nerveuse. La grande objection à cette hypothèse consiste dans le fait que la vitamine B₁ agit très rapidement puisque la plupart des phénomènes nerveux (paralysie ou convulsion), produits par sa carence, cessent dans les quelques heures qui suivent l'absorption de vitamine B₁. En même temps que s'amendent les phénomènes nerveux, il s'en suit une rapide augmentation du poids de l'animal. Jansen signale que le poids d'un rat de 100 grammes, qui avait diminué chaque jour de 3 à 4 grammes, pendant les derniers jours avec une nourriture dépourvue de vitamine peut, à la suite d'une dose d'environ 20 mg. de cette vitamine B₁, augmenter de 10 à 15 grammes en une seule journée. C'est cette influence sur l'assimilation qui a incité certains auteurs à considérer la vitamine B₁ comme catalyseur. Un certain nombre de chercheurs ont étudié l'action de cette vitamine sur la respiration des tissus, en utilisant l'appareil de Warburg. Les résultats, dans l'ensemble ne donnèrent pas de résultats probants. Depuis lors, Peters, d'Oxford, reprit la question et il étudia l'action de la vitamine B₁ sur la respiration de tissu cérébral de pigeon. Il avait été amené à étudier le tissu cérébral, parce qu'ayant observé

de nombreux cas de polynévrites, chez le pigeon, il était convaincu que la polynévrite par avitaminose B₁ déterminait des altérations, non seulement du système nerveux périphérique, mais encore du système nerveux central. Il compara donc la respiration cérébrale des pigeons nourris normalement et de ceux carencés en vitamine B₁. Il n'eut de résultat positif qu'en ajoutant à la matière cérébrale une certaine quantité de glucose, d'acide lactique ou d'acide pyruvique: Dans ces conditions expérimentales, le cerveau des pigeons atteints de polynévrites respirait plus faiblement que les témoins. La respiration augmenta en additionnant de vitamine B₁ les cerveaux de pigeons carencés, tandis que cette addition était sans influence sur la respiration des pigeons normaux.

Les expériences de Peters montrèrent que la vitamine B₁ joue un rôle important dans l'assimilation des hydrocarbures. Des auteurs américains ont également montré, en utilisant des chiens opérés suivant la méthode Pavlow, c'est-à-dire présentant des fistules stomacales, que la sécrétion du suc gastrique est influencé par la vitamine B₁; sans elle, il n'y a pas de sécrétion; ceci explique dans une certaine mesure l'action de la vitamine B₁ sur l'appétit et en conséquence sur la perte ou la reprise du poids des sujets soumis à une carence en vitamine B₁, ou à un régime comportant une dose suffisante de vitamine B₁.

La découverte de la vitamine B₁ et de son action fut immédiatement mise en pratique dans de nombreux pays du monde, notamment dans les Indes, à Delhi par Schüffner et, le béribéri disparut dans tous les secteurs où l'on eut la possibilité de faire absorber aux indigènes la vitamine B₁.

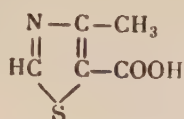
B) Constitution chimique de la vitamine B₁

C'est Funk qui le premier envisagea dès 1912 l'existence d'un noyau pyrimidique dans la molécule de vitamine B₁. Plus tard, Jansen se basant sur l'analyse élémentaire admit que la vitamine B₁ devait contenir un cycle d'imidasol ou de pyrimidine, mais il négligea la teneur en soufre. En 1932, Windaus obtint une substance pure extraite de son de riz. Il mit en évidence le soufre et donna une formule brute exacte :

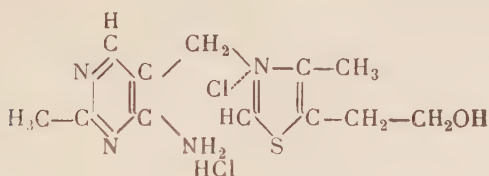


Windaus et ses collaborateurs apportèrent de nouveau

en 1934 une importante contribution à la découverte de ce nouveau corps. Par une oxydation nitrique, il obtint deux fractions nettement différenciées : un éther éthylique d'un dérivé de la pyrimidine et un acide soufré. En 1935 Williams, à New-York put identifier l'acide soufré au 5 carboxy-4-méthyl-thiazol :



L'observation, jointe au hasard permit à Williams d'imaginer une méthode permettant de scinder la vitamine en ses deux fragments; Williams ajoutait de l'acide sulfureux à ses extraits de riz afin d'en assurer la conservation; or, il constata que l'addition d'acide sulfureux le rendait totalement inactif et il vit que sous cette action la vitamine B₁ se scindait en deux fractions un dérivé de thiazol et l'autre de pyrimidine. Quand on eut la certitude que la vitamine B₁ résultait de la combinaison directe des deux fractions, on donna plusieurs formules de la vitamine B₁. Il faudrait citer les travaux de Williams, Burger, Todd, Windaus ; toutefois, ce sont deux japonais, Makino et Imaï qui ont donné la formule exacte en 1936. Ces travaux furent confirmés presque simultanément et la formule donnée fut reconnue exacte :

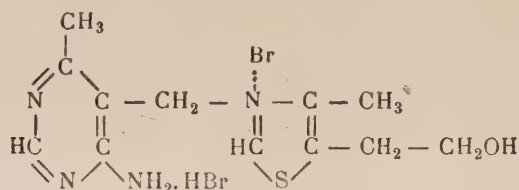


Ce composé chimique est désigné maintenant sous le nom d'*aneurine* ou *vitamine B₁*.

Sa synthèse est réalisée soit par le procédé Todd et Bergel, qui consiste à former directement un dérivé thiazolique avec un dérivé soufré de la fraction pyrimidique, soit par celui d'Andersag, Westphal, Williams qui consiste à traiter le dérivé bromé de la pyrimidine par le composé thiazolique.

Il était intéressant de savoir de quoi dépendait l'activité vitaminique. Plusieurs travaux ont montré que les

moindres détails de cette structure avaient leur importance (Boulanger). C'est ainsi que Andersag et Westphal ont pu préparer un isomère de l'aneurine dans lequel le groupement méthyle du noyau pyrimidique est en position 6 au lieu d'être en position 2 :



Les auteurs constatèrent que ce corps était beaucoup moins actif que l'aneurine; mais cela permit aussi de voir que l'action spécifique n'était pas limitée à une seule substance, mais à un groupe de corps très voisins (Boulanger).

En outre, on constata que, parmi les groupements fonctionnels, la fonction animée libre était indispensable à l'activité vitaminique puisque sa transformation en hydroxyle rend l'aneurine inactive. Il en est de même pour l'atome d'hydrogène de carbone 2 du cycle thiazolique; son remplacement par un substituant quelconque fait perdre l'activité vitaminique. Enfin, si l'on esterifie l'oxhydyle de la chaîne latérale par une molécule d'acide pyrophosphorique, l'activité physiologique du nouveau corps est nulle. (Boulanger).

De nombreux travaux ont montré que certaines espèces végétales peuvent se contenter de l'un des radicaux de la vitamine B₁, soit le cycle thiazolique, soit le cycle pyrimidique. D'autres ont besoin d'un mélange des deux. Il en est ainsi pour *Phycomyces* (Schopfer). D'autres encore, comme *Glaucoma piriformis* et *Strigomonas* (A. Lwoff et M. Lwoff) demandent l'aneurine elle-même. Il en est de même pour le staphylocoque doré (Knight).

III

Les méthodes biologiques de dosage de la vitamine B₁

Pour déterminer la quantité de vitamine B₁ contenue dans une substance quelconque, un certain nombre de méthodes ont été décrites. Plusieurs s'appuient sur des réaction biologiques : les principales sont les suivantes :

- 1° Le test de bradycardie.
- 2° Le test « catatorulin ».
- 3° Les test-pigeon.
- 4° Les test-rat.
- 5° Le test-phycomyces.

Parmi les méthodes d'ordre chimique ou physico-chimiques, nous citerons la réaction azo-formaldehyde; la méthode de Jansen, la méthode de Prebluda et Mac-Colum etc...

Dans ce chapitre nous passerons seulement en revue les quatre premières méthodes biologiques citées plus haut, nous réservant d'étudier plus en détail dans un chapitre spécial le *test-Phycomyces* qui fait le principal objet de ce travail.

A) Test de Bradycardie dans le titrage de la vitamine B₁.

Le principe de cette méthode, préconisée par Birch Harris en 1934, réside dans la recherche de la durée de la guérison des symptômes de bradycardie déterminé par un régime déficient en vitamine B₁. Cet auteur avait en effet remarqué qu'un régime carencé en vitamine B₁ détermine chez le rat un abaissement très notable du nombre de ses pulsation cardiaques, résultat fort curieux puisque chez l'homme on note dans les mêmes conditions, une accélération des pulsations cardiaques. Cette bradycardie n'est pas due à une action du vague, mais

elle est d'origine sinusale; l'intérêt capital de cette constatation résidait dans le fait que cette bradycardie du rat était spécifique de l'absence de la vitamine B₁ et n'était pas causée par d'autres déficiences du régime (L.J. Harris). Cet auteur montra également que les autres constituants d'un complexe de vitamines B n'avaient pas d'action. Enfin il fut montré de façon tellement précise, que l'effet était tellement bien proportionnel à la déficience en vitamine B₁ que l'idée vint à Birch et Harris d'utiliser ce principe en vue d'un dosage de la vitamine B₁.

La méthode consistait donc à soumettre les rats pendant une quarantaine de jours à un régime carencé en vitamine B₁. Au bout de ce temps on constate que le nombre des pulsations descend de 500 aux environs de 300 par minute. Si on donne alors à ces animaux une certaine quantité de vitamine B₁, le nombre des pulsations remonte en quelques heures à la normale.

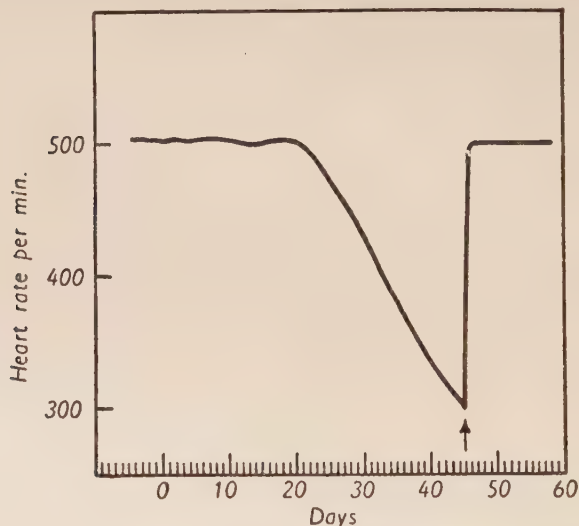


FIG. 1. — Chute des pulsations cardiaques d'un rat soumis à un régime carencé en vitamine B₁ (d'après L. Harris). L'effet obtenu est exactement proportionnel à la totalité de la vitamine B₁ donnée.

Le même rat peut être utilisé plusieurs fois, la guérison temporaire résultant de chaque dose de matière vitaminée (B₁) continuant à être en rapport avec l'activité vitaminique.

Il faudra donc déterminer d'une part la durée de guérison temporaire apportée par la substance de dose in-

connue en vitamine B₁, d'autre part on déterminera la durée de la guérison obtenue avec un Standard comme celui de la ligue de la Société des Nations, par exemple.

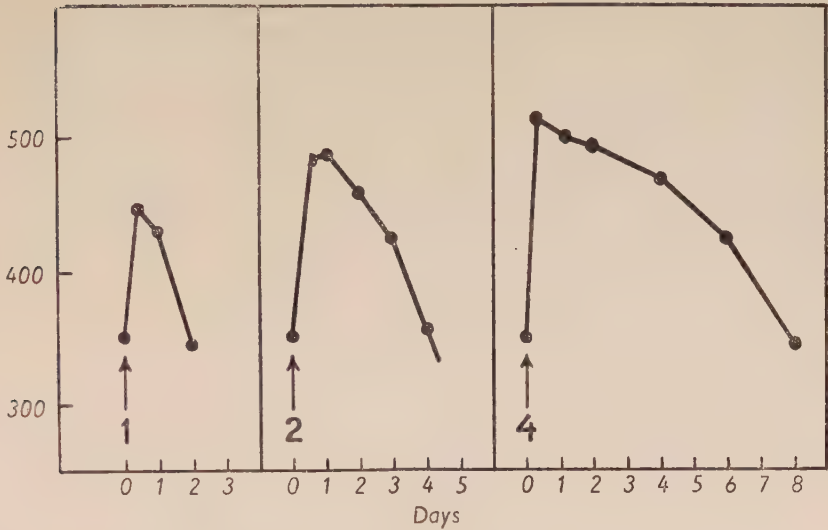


FIG. 2. — La durée de la guérison est proportionnelle à la totalité de la vitamine B₁ donnée (d'après Birch et Harris).

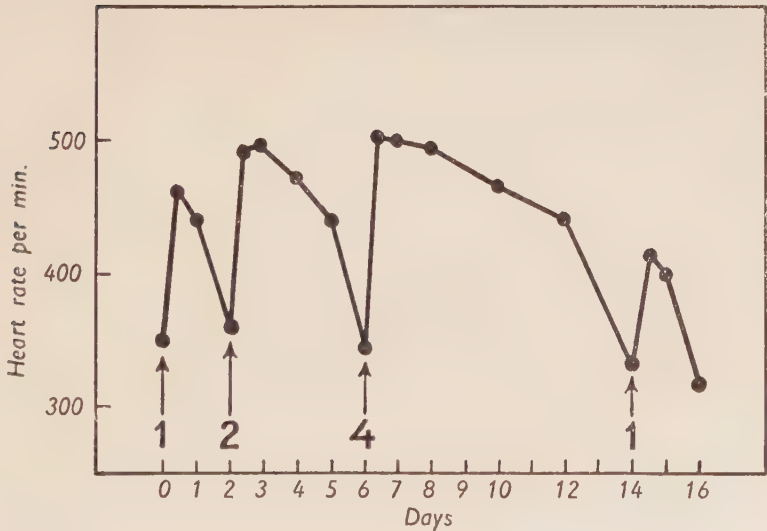


FIG. 3. — Doses successives de vitamines B₁ administrée au même rat (d'après Birch et Harris).

Il est bien évident que les battements du cœur de rat sont trop rapides pour qu'on puisse les compter comme on peut le faire pour les pulsations humaines. Il faut utiliser à cet effet un électro-cardiographe. Cette méthode présente plusieurs avantages dont les principaux paraissent être la spécificité, la sensibilité. D'après Harris, elle conviendrait parfaitement au dosage des vitamines B₁ dans les aliments pauvres en cette vitamine.

Dans une revue générale des méthodes de dosage de la vitamine B₁, nous ne pouvons entrer dans les détails techniques. Nous renvoyons pour cela aux publications de Harris, Birch, Leong, Todd, Weiss, Haynes etc...

B) La réaction "Catatorulin"

L'accroissement de poids des animaux carencés en vitamine B₁ puis soumis à un régime non carencé avait fait supposer que la vitamine B₁ exerçait une influence sur l'assimilation, en agissant comme un catalyseur. C'est pourquoi de nombreux auteurs ont examiné les effets de la vitamine B₁ sur la respiration des tissus. Ils utilisèrent pour ces travaux l'appareil de Warburg ou des appareils similaires. D'après les publications de ces nombreux savants on pouvait dire que les résultats ne concordaient pas, puisque la moitié mettait en évidence un effet qui était nié par les autres.

Peters reprit la question. Il était persuadé que la carence de vitamine B₁ chez le pigeon déterminait non seulement des altérations du système nerveux périphérique, mais aussi du système nerveux central. Il compara la respiration du tissu cérébral de pigeon carencé et de pigeon normal ; il ne décelait alors pas de différence. Mais en additionnant la matière cérébrale de glucose, d'acide lactique ou mieux encore d'acide pyruvique, il constata une différence très nette : le tissu cérébral du pigeon polynévrité respirait plus faiblement. En ajoutant de la vitamine B₁ pure à cette cervelle du pigeon malade, la consommation en oxygène augmentait.

Le « Catatorulin test » est donc établi sur les constatations citées. La quantité de vitamine B₁ présente est calculée en comparant l'augmentation de l'oxygène absorbé après addition de la substance et celle obtenue après addition d'une quantité connue de vitamine B₁.

C) Le test-pigeon

La vitamine B₁ est indispensable à la vie. Parmi les animaux les plus sensibles, on trouve dans nos pays le pigeon.

Chez le pigeon soumis à un régime privé de vitamine B₁ on constate l'apparition de différents phénomènes. Pour la grande majorité, des signes de polynévrite apparaissent ; nous les décrirons plus loin. Toutefois quelques pigeons meurent subitement sans présenter aucun signe et d'autres meurent plus tardivement sans avoir présenté d'autres signes que de la torpeur, de la somnolence et une profonde asthénie.

Dans plus de 80 % des cas on observe les phénomènes nerveux et thermiques dont l'apparition et la régression sous l'influence de la vitamine B₁ a permis d'établir une méthode de dosage de cette vitamine. Au bout de 2 à 3 semaines de régime carencé en vitamine B₁ on constate une paralysie du pharynx. Le pigeon se laisse gaver, son jabot se distend, mais il ne se vide plus. Des troubles moteurs se manifestent : l'animal ne peut plus se tenir sur son perchoir (paralysie des muscles fléchisseur des pattes). Il tremble presque constamment, sa démarche est incertaine et le vol devient impossible, l'animal tombe fréquemment en avant en écartant les ailes ; il présente le phénomène de la rétraction de la tête, avec ou sans torsion latérale, rétraction déterminée par la paralysie des muscles du cou.

Arrivé à ce stade, le pigeon présente alors les crises typiques de polynévrites; Mme Randoin les a bien décrites : des contractures tétaniques se produisent qui ont pour effets principaux de projeter en avant les pattes et les doigts en hypertension et de renverser la tête en arrière. Puis les ailes se mettent à battre rapidement, pendant que le corps de l'oiseau, culbutant en arrière, se trouve animé d'un mouvement rapide de rotation, très impressionnant à observer. Ces violentes crises durent de trente à cent vingt secondes et sont immédiatement suivies d'une accélération transitoire très marquée des contractions cardiaques et des mouvements respiratoires. La température centrale du corps est de plusieurs degrés au-dessus de la normale. Elle tombe de 41° — 42° à 38° — 39°.

On a imaginé différentes méthodes de dosage de la vitamine B₁ en utilisant le pigeon.

On doit citer d'abord le test dû à Kinnersley et Peters. On prend des pigeons présentant des crises typiques de

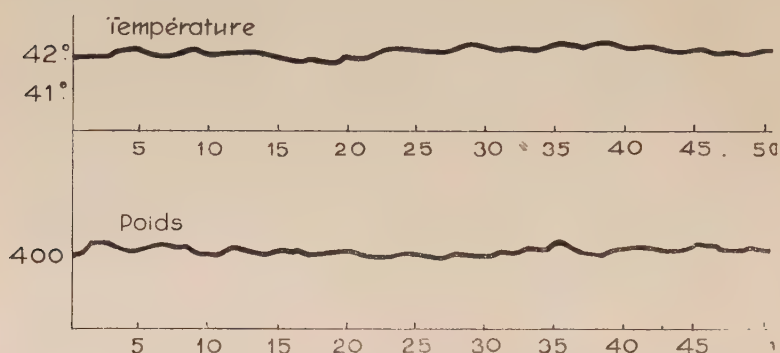


FIG. 4. — Courbes correspondant à un pigeon soumis à un régime complet (contenant en particulier la vitamine B₁).

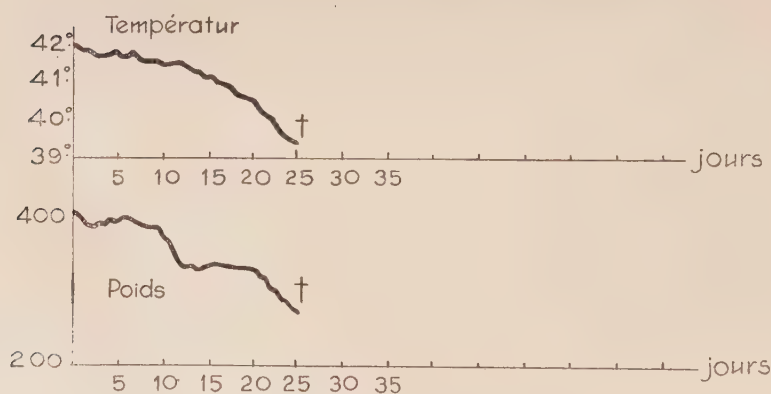


FIG. 5. — Pigeon soumis à un régime carencé en vitamine B₁.

polynévrite. A ce moment-là on leur fait absorber une dose unique de la substance étudiée. On attend alors la réapparition d'une crise. Pour obtenir la quantité d'aneurine quotidienne nécessaire au pigeon on divise le poids de la dose donnée par le nombre de jours qui a séparé deux crises.

Ce n'est pas ce test que nous avons utilisé dans nos expériences. Nous allons maintenant donner un bref aperçu de celui que nous avons employé.

Technique de la méthode. — Elle comprendra deux modalités et elle sera dite soit préventive, soit curative.

La méthode préventive consistera à déterminer la quantité de substances vitaminées juste nécessaire pour prévenir tout accident nerveux; on en conclura que cette quantité de substance à analyser contient le nombre d'unités de vitamine B₁ indispensable à la vie d'un pigeon normal. D'autre part, dans des expériences simultanées on détermine la dose d'étalon international de vitamine B₁ nécessaire et suffisant pour entretenir la vie de l'animal considéré. La comparaison des deux chiffres obtenus permet de calculer la quantité de vitamine contenue dans la substance analysée. La méthode curative consistera à faire absorber par gavage à des pigeons un régime totalement privé de vitamine B₁.

Dès l'apparition des premiers symptômes graves, on additionne le régime de quantités variables de la substance dont on veut connaître le titre en vitamine B₁. Pour un autre lot de pigeons on fait de même avec une préparation étalon de vitamines B₁. On compare les quantités nécessaires et suffisantes des deux substances contenant la vitamine B₁ ce qui permet de connaître la teneur de l'une d'elles, connaissant celle de l'autre.

D) Le test rat (Scheunert)

De nombreux auteurs utilisent le test rat pour le dosage biologique de la vitamine B₁ de préférence à celui fourni par le pigeon. Krieger Lassen qui a comparé les deux tests considère celui donné par le rat comme supérieur en précision.

La méthode générale consiste à avoir des lots de rats pour les régimes desquels on élimine toute trace de vitamine B₁ pendant une certaine période; on donne ensuite à différents lots de rats carencés en vitamine B₁ des quantités variables de la substance à étudier contenant la vitamine B₁. La méthode consiste alors à déterminer la dose pour laquelle on obtient d'une façon régulière, des augmentations de poids suffisamment nettes. Sherman considère que 3 grammes par semaine suffisent, Chick et Roscoe demandent environ de 10 à 14 grammes. A. Scheunert, considère que les tests de croissance sont assez incertains, à cause des grandes fluctuations qui se produisent dans la pente de courbes de croissance. Il a proposé une méthode qui élimine l'appréciation de la vitesse de croissance, et qui consiste à rechercher la dose qui maintient les animaux à leur poids.

Il utilise de jeunes rats de 55 à 60 grammes. Ces animaux de poids un peu plus élevé que ceux utilisés en général pour les dosages de vitamine, résistent mieux à une alimentation préparatoire carencée, et l'on sait que la suppression de la vitamine B₁ exige une grande résistance de la part des animaux.

Scheunert isole les rats dans des cages grillagées, et les soumet au régime qu'il a décrit. La période préparatoire dure en moyenne de 2 à 3 semaines. C'est à ce moment là que commence la période d'expériences, proprement dite qui dure environ 35 jours.

La tâche consiste à trouver la dose qui amène les rats au delà de la période d'expérience sans mourir, sans présenter de convulsions, et sans perdre plus de 2 grammes par rapport au poids du corps existant au début de la période d'expérience. Le Professeur Scheunert estime que lorsque 8 rats sur 10 ont satisfait à ces conditions, la dose est alors la dose limite cherchée. La dose immédiatement au-dessous ne remplit plus les conditions prescrites : on note des pertes de poids plus grandes, des convulsions et parfois la mort dans le courant de l'expérience.

Cette méthode a donné d'excellent résultats au Professeur Scheunert à Leipzig, à M. Schleblich qui a comparé une préparation de standard international fourni par le National Institut for Medical Research et une autre préparation fournie par l'office de la Santé publique du Reich. Les résultats obtenus ont été très satisfaisants, et leur constance a été constatée à plusieurs années de distance.

E) Les nouveaux test pigeons et rats (Randoïn et le Gallic)

1° Test-Pigeons :

C'est un test préventif. L. Randoïn admet que le nombre de jours durant lequel la température du pigeon reste égale ou supérieure à $41^{\circ}5$ est lié à la quantité de vitamines B₁ contenues dans le régime de base. L. Randoïn porte sur un graphique les résultats obtenus : les abscisses sont proportionnelles à la dose de substances ingérées ; les ordonnées sont proportionnelles au nombre de jours définis.

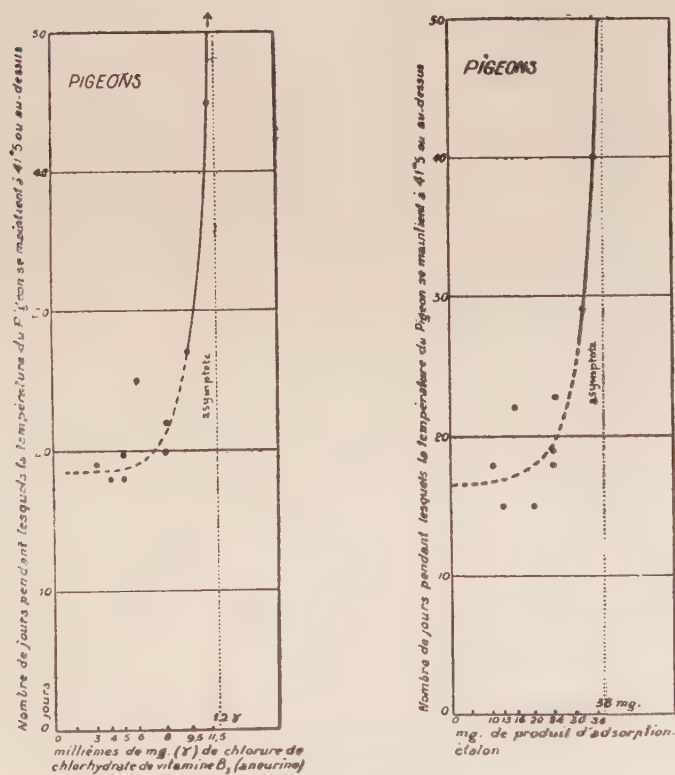


FIG. 6. — (d'après L. Randoïn et Le Gallic).

L'auteur a constaté que le nombre de jours obtenus pour une même préparation était variable pour des pigeons différents. Cette différence est d'autant plus gran-

de que la dose de la substance étudiée s'éloigne de la dose nécessaire et suffisante pour assurer pendant au moins 3 mois la survie de l'animal. Enfin, L. Randoïn a constaté que toute irrégularité individuelle disparaît dès que la dose quotidienne de la substance étudiée devient voisine de la dose minima nécessaire à l'entretien du pigeon.

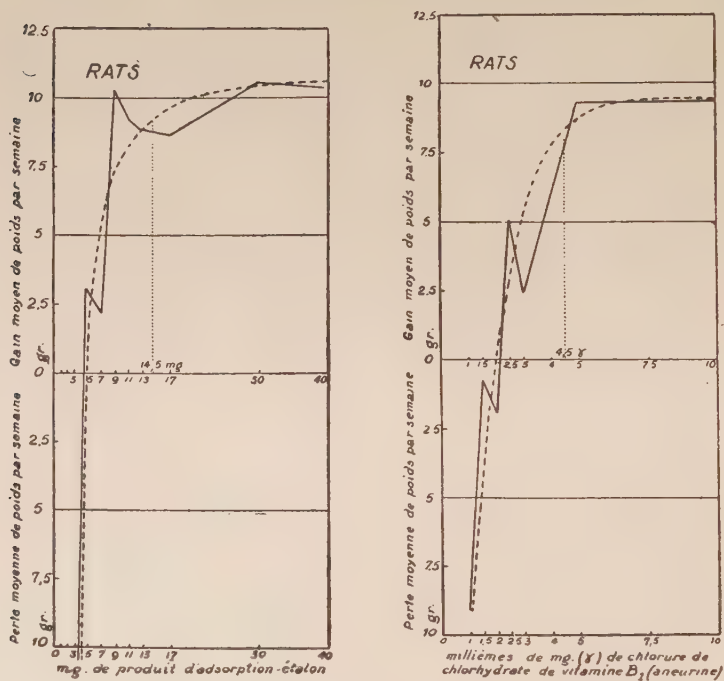


FIG. 7. — (d'après L. Randoïn et Le Gallic).

On constate que le « nombre de jours » augmente régulièrement avec la dose quotidienne de substance active donnée au pigeon, et la courbe qui joint les points représentatifs sur le diagramme est asymptotique à une droite parallèle à l'axe des ordonnées, qui a pour abscisse la dose minima cherchée, laquelle se trouve ainsi déterminée avec une grande précision (Randoïn).

2° Test-Rats :

En même temps qu'elle donnait la méthode précédente utilisant le pigeon comme animal réactif, Mme L.

Randoin et le Gallic publiaient le principe d'une méthode utilisant le rat. Cette méthode consiste essentiellement en une *évaluation des vitesses moyennes de croissance des jeunes animaux*. Voici l'exposé de la méthode telle que nous la décrit Mme Randoin ;

1° On donne à de jeunes rats de 30 grammes qui, ayant reçu un régime exclusivement privé de vitamine B₁, viennent de cesser de croître, des doses variables de la substance dans laquelle on doit doser cette vitamine.

2° On calcule à la fin de l'expérience les vitesses moyennes de croissance pendant 6 semaines au maximum.

3° On porte sur un diagramme : en ordonnée les vitesses moyennes de croissance des rats, en abscisse les poids de la substance donnée aux rats de manière à obtenir une série de points représentatifs du phénomène étudié.

4° On trace enfin la courbe moyenne qui passe « à travers » tous ces points, courbe dont l'allure est évidemment la même pour tous les dosages de vitamine B₁ (Fig. 7).

On caractérisera l'activité en vitamines B₁ d'une substance quelconque en prenant le poids de cette substance qui correspond à l'abscisse du point de courbure maxima de la courbe moyenne : ce poids est celui qui assure une croissance voisine de la croissance la plus rapide que l'on peut obtenir avec le régime de base complété par une dose suffisante de vitamine B₁ : on détermine un seuil (Randoin).

Il existe d'autres méthodes reposant spécialement sur des réactions chimiques. Elles sortent donc du cadre des tests biologiques que nous nous somme tracé ; cependant nous en citerons quelques-unes :

1° *La méthode Kinnersley et Peters*. — C'est une méthode colorimétrique utilisant la diazo-réaction (formaldéhyde-azo-test). Ce test a été amélioré par les auteurs en utilisant l'alcool butylique; cette méthode est utilisée pour l'estimation approximative de la vitamine B₁ contenue dans les aliments.

2° *La méthode de Jansen* consiste à oxyder la vitamine B₁ par le permanganate de potassium et à la transformer en thiochrome que l'on dose par l'étude de sa fluorescence.

3° *La méthode de Prebluda et Mac Collum*. — Cette méthode s'appuie sur la réaction très sensible du P-amino-acétanilide qui donne avec la vitamine B₁ une coloration pourpre.

IV

Le test phycomyces. = **Description de la méthode**

Dans plusieurs notes parues depuis 1931, W. H. Schopfer a énoncé le principe d'une méthode nouvelle de dosage de la vitamine B₁ (aneurine) au moyen d'un test végétal constitué par *Phycomyces*, champignon du groupe des mucorinées. W. H. Schopfer a montré que ce champignon ne se développe pratiquement pas en l'absence de la vitamine B₁ et que la quantité de culture de ce micro-organisme évalué en poids est proportionnelle à la quantité de vitamine B₁ contenue dans le milieu. L'auteur a montré qu'une dose croissante de ce facteur, sous forme cristallisée provoque un développement du micro-organisme jusqu'à un point optimum à partir duquel toute adjonction nouvelle de vitamine reste sans effet (Schopfer). Tous les échantillons étudiés par l'auteur lui ont donné des résultats analogues.

La méthode consiste à établir une courbe des poids des cultures desséchées de *Phycomyces* en fonction de la quantité de vitamine B₁ contenue dans le milieu de culture. Ces poids maximum varient entre 80 et 100 milligrammes dans les conditions expérimentales décrites plus loin. W. H. Schopfer a utilisé des solutions de vitamine à 0,2 γ par cm³, ce qui lui a permis en employant des doses variant de 5/100 à 4 cm³ d'observer le début du développement ainsi que son maximum.

De plus il a été établi que l'action de la vitamine est étroitement liée à la teneur en azote du milieu, en augmentant l'azote, ou élève le plafond d'action de l'aneurine (Schopfer). Les graphiques tridimensionnels établis par l'auteur de la méthode et publiés au Congrès de Scheveninghe (1937) et que nous reproduisons ci-dessous montrent avec précision, ce fait :

Ces figures expriment l'action de l'aneurine pour 4 doses d'asparagine.

Le développement maximum est d'autant plus faible que la teneur en azote du milieu est plus faible. Schopfer a établi que le rapport entre la dose de vitamine

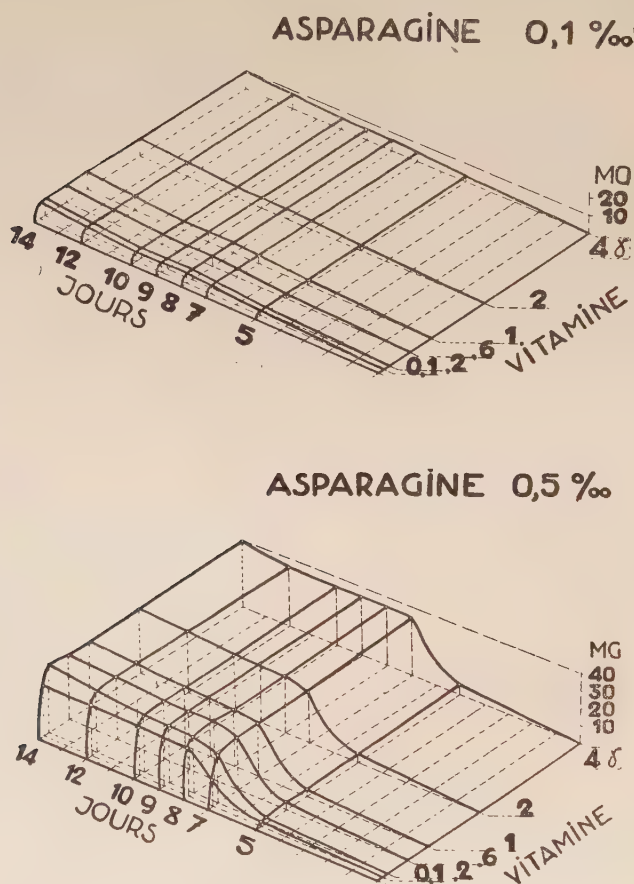
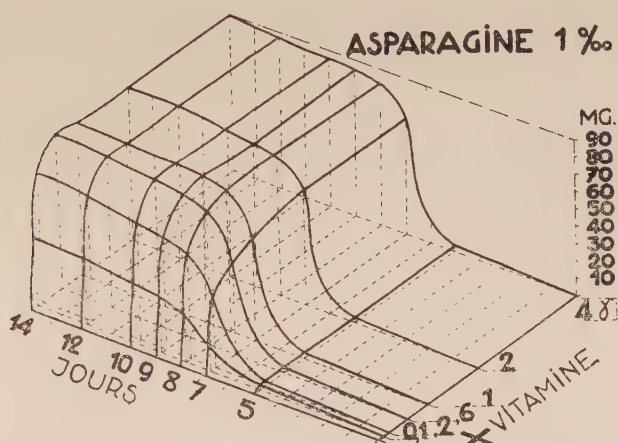


FIG. 8. — (d'après W. H. Schopfer).

fournissant le développement maximum (en γ .) et ce poids maximum lui-même (en mg), donne quelque soit la dose d'asparagine (de 0,1 ‰ à 4 ‰) un chiffre relativement constant, soit 0,005 γ ; c'est ce chiffre que l'auteur pris comme unité *Phycomyces* de vitamine B₁.

Il exprime le poids nécessaire d'aneurine pour obtenir dans les conditions de ces expériences, 1 mg sec de matière vivante (Schopfer).



ASPARAGINE 4 ‰

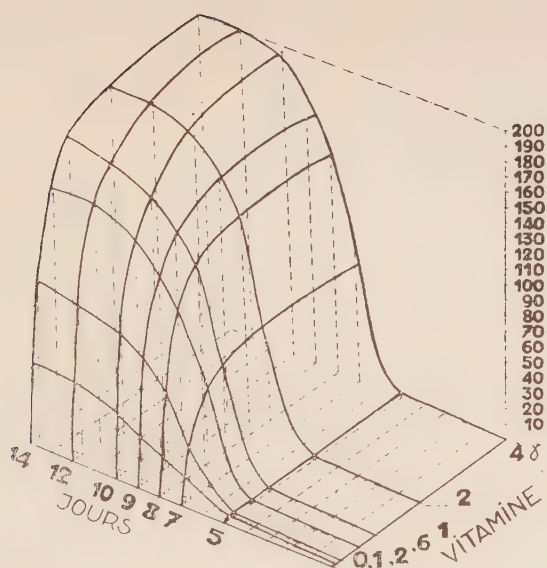


FIG. 9. — (d'après W. H. Schopfer).

Devant des résultats aussi réguliers, Schopfer s'est demandé si *Phycomyces* ne pourrait pas être utilisé pour décèler la quantité de vitamines B₁ contenue dans divers produits.

Il considéra qu'il suffisait de tracer d'une part la courbe de développement de *Phycomyces* en utilisant des doses connues de vitamines B₁, d'autre part de rechercher les doses du produit à titrer qui donnent une courbe de croissance de *Phycomyces* recouvrant la première.

Schopfer a utilisé dans ses essais la vitamine B₁ cristallisée et de diverses origines et le Standard International (adsorbat de terre à foulon). Nous donnons une série de courbes publiées par l'auteur. Nous signalons

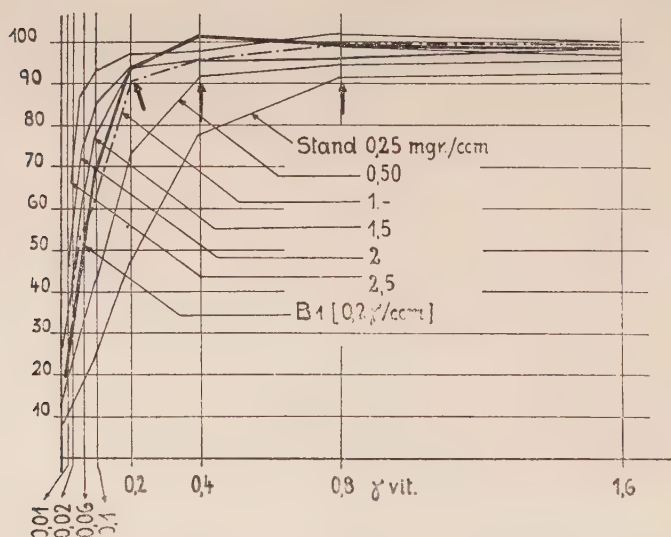


FIG. 10. — Sur l'abscisse, les quantités absolues de vitamines. (d'après Schopfer).

avec lui que les quantités de vitamine portées sur l'abscisse, de 0,01 à 1,6 γ, se rapportent à la courbe standard, établie avec une solution de vitamine à 0,2 γ par cc. (5/100 1/10 3/10 5/10, 1, 2, 4 et 8 cm³) ; ces volumes sont également ceux des solutions à titrer.

Cette figure indique qu'avec des concentrations de standard 2 et 4 fois plus faibles, le même développement optima est obtenu avec des volumes de solution 2 et 4 fois plus grand (Schopfer).

L'auteur a montré également qu'il n'était pas possible d'obtenir un graphique de base définitif auquel on pourrait rapporter les observations faites avec le produit à doser. Les points trouvés ne se recouvrent pas tout à fait. Cela provient du fait connu qu'il est pratiquement impossible de reproduire deux cultures dans des conditions expérimentales identiques. On tourne la difficulté en refaisant pour chaque titrage une courbe avec le Standard ou la vitamine cristallisée.

La détermination de la quantité de vitamine B₁ d'un produit sera d'autant plus précise que cette vitamine sera accompagnée de moins de substances étrangères.

La quantité de glucides du milieu dépasse beaucoup celle qui est juste nécessaire à la croissance de *Phycomyces* ; elle est choisie à dessein, afin que, la croissance terminée, le microorganisme puisse couvrir sa respiration d'entretien sans subir d'autolyse trop marquée, sans perdre du poids (Schopfer).

L'augmentation de la teneur du milieu en azote détermine un relèvement de la courbe, on trouve là un inconvénient lorsque le produit à titrer contient beaucoup d'azote, on peut y remédier en dosant cette azote et en ajoutant au standard une dose équivalente d'azote assimilable. Pour toutes les déterminations ou l'azote n'est pas en trop grande quantité, la mesure est toujours possible.

Voici les prescriptions relatives à la méthode, prescriptions indiquées par l'auteur :

1° La culture de la courbe étalon se fait sur milieu malté (malt 2 %, agar 2 %).

2° Le milieu d'expérience synthétique est constitué de la façon suivante :

Glucose 5 % ;

Asparagine 1 ‰ ;

Sulfate de magnésie 0,5 ‰ ;

Phosphate acide de potassium 1,5 ‰ ;

Eau distillée.

3° Ce milieu est réparti dans des fioles d'Erlenmeyer de 150 cm³ à raison de 25 cm³ de liquide par fiole.

4° L'opération suivante consiste dans l'addition au milieu de la solution contenant le standard de vitamine B₁ ou le produit à titrer. Il sera bon de déterminer par des expériences préliminaires les concentrations à utiliser pour le produit inconnu.

5° L'inoculation se fait au moyen d'une suspension fraîche de spores ; on utilisera une suspension assez dense. La richesse de cette suspension influe, non sur le poids final, mais sur le temps nécessaire pour l'obtenir. Il faut que toutes les séries soientensemencées en même temps avec la même quantité de spores.

6° Afin d'obtenir un voile homogène les cultures devront être brassées dans les deux premiers jours, avant l'organisation du thalle. Il ne faudra plus y toucher par la suite. Les cultures seront placées dans une étuve à 24° et dans l'obscurité complète, la lumière paraissant avoir une influence non négligeable.

7° Vers le 10^e jour on procède à la récolte, au séchage à 100° et à la pesée.

Après l'opération (4) on stérilise le milieu à 112-113° pendant 15 minutes. L'acidité du milieu empêche la destruction de la vitamine B₁. W. H. Schopfer signale en outre que l'établissement d'un graphique est indispensable ; il nous dit que l'utilisation d'une échelle logarithmique facilite la lecture des courbes en les séparant, et de ce fait augmente l'exactitude de la lecture et par conséquent de la méthode.

Recherches personnelles comparatives sur la valeur des tests rats, pigeons, phycomyces

Dans ce chapitre nous avons exposé nos recherches personnelles concernant le titrage biologique de l'aneurine. Nous avons étudié parallèlement les tests pigeons et rats, ainsi que le test phycomyces de W. H. Schopfer. Nous avons décrit ces méthodes dans les pages qui précèdent ; avant de donner le résultat de nos expériences, nous allons donner un bref résumé des conditions expérimentales particulières.

Les substances vitaminées dont nous avons recherché le titre en vitamine B₁ (aneurine) proviennent de différentes sources suivantes :

1° Standard international (adsorbat sur terre à foulon fournie par le laboratoire de Mme Randoïn).

2° Aneurine cristallisée de H.R.

3° Aneurine cristallisée de I.G.

4° Adsorbats de vitamines B₁ sur différents échantillons de terre à foulon : VK, V₁K₁, V₂K₂, V₃K₃, V₄K₄.

Les différents adsorbats ont été préparés au laboratoire à partir d'extrait de levure de bière fraîche. Le principe général de la manipulation était le suivant : la levure était délayée dans l'eau additionnée d'acide salicylique et de toluène ; le *ph* était ajusté à 4,5. On filtrait sur papier après 48 heures de contact. La terre à foulon était alors mise en suspension dans le filtrat qui était alors agité pendant 36 heures.

Les terres à foulon que nous avons utilisées provenaient de différents pays (France et Angleterre). Leur pouvoir adsorbant était mesuré par l'essai de Seidell à la quinine. Toutes ne répondaient d'ailleurs pas au pouvoir défini par Seidell. Les produits marqués V₂K₂ et V₄K₄, terres de la province de Surrey y satisfaisaient seules ; les autres avaient un pouvoir adsorbant plus faible.

Test pigeon. — Nous avons toujours utilisé pour ce test, trois lots simultanés de pigeons d'âge et de poids approximativement égaux.

Le premier lot était soumis au régime artificiel contenant la quantité nécessaire et suffisante de vitamine B₁ (Standard International) à la vie du pigeon.

Le deuxième lot recevait le régime artificiel privé de la vitamine B₁. Les pigeons présentaient les troubles que nous avons décrits dès la troisième semaine, parfois même avant. Ces crises étaient alors traitées les unes par la quantité minima de Standard nécessaire à la vie, soit par des quantités variables de la substance dont nous voulions connaître le titre en vitamine B₁ (méthode curative).

Le troisième lot recevait le régime artificiel complété par des doses variables et croissantes de la substance à étudier. Nous considérons les expériences sur une période voisine de 3 mois, période au cours de laquelle nous pouvions examiner le début des crises et leur guérison.

Chaque lot comprenait toujours un minimum de 5 pigeons. Nous donnerons le protocole complet des expériences concernant l'un des produits d'absorption, nous contentant, faute de place, de donner les grandes lignes des autres expériences.

Produit d'adsorption V₄ K₄

Les trois lots de pigeons seront répartis de la façon suivante :

1^{er} lot : 5 pigeons alimentés par gavage au moyen du régime de Mme Randoin et H. Simonnet additionné de 0.04 gr. de Standard international de vitamine B₁ (Tableau I).

Le régime de Mme L. Randoin et H. Simonnet est ainsi composé :

	Gr.
Caséine purifiée	6
Fibrine purifiée	5
Ovalbumine purifiée	5
Graisse de beurre purifiée	4
Dextrine purifiée	66
Mélange de sels	4

Aliments encombrants :

Agaragar	8
Papier filtre	2
Levure autoclavée par animal et par jour	2

2^e lot : 10 pigeons soumis au même régime artificiel auquel on a ajouté des doses quotidiennes variables pour chaque pigeon et allant de 0,04 gr. à 0,8 gr. par pigeon (essai préventif). (Tableau II).

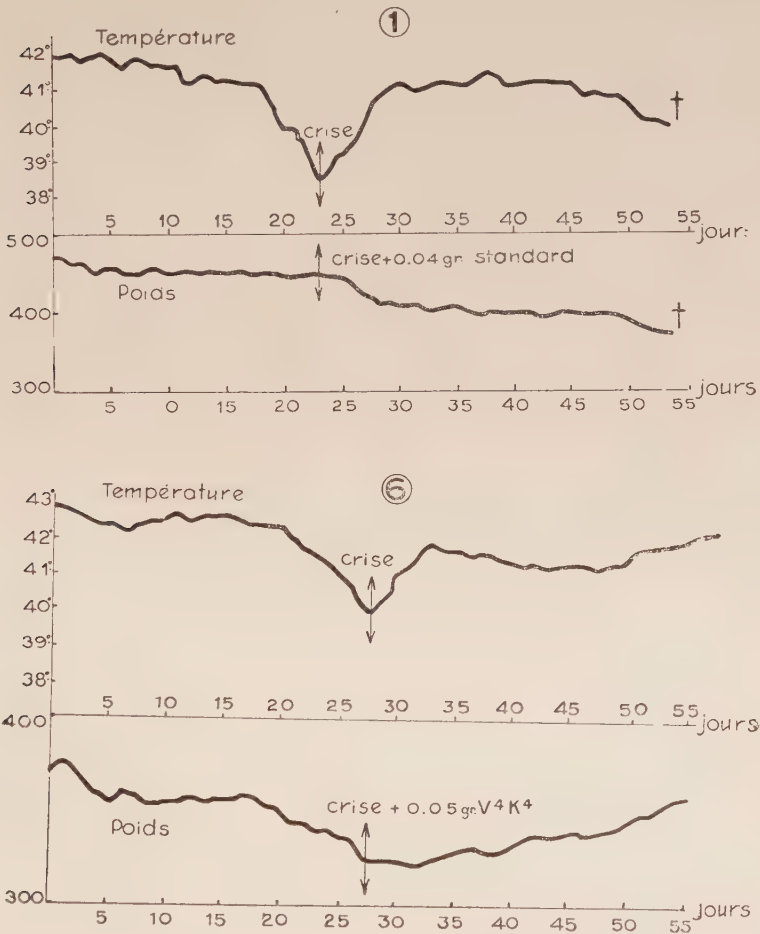


FIG. 11. — En haut, courbes correspondantes à un pigeon soumis d'abord à un régime carencé en vitamine B₁ ; ensuite même régime, additionné de 0,04 gr. St. International. — En bas, courbes correspondantes à un pigeon soumis d'abord à un régime carencé en vitamine B₁, ensuite au même régime additionné de 0,05 gr. de produit V₄K₄.

Tableau I. — Dosage de la vitamine B₁ contenue dans V₄ K₄ (méthode préventive). — 1^{er} premier lot de pigeons = 0,04 gr. de Standard International.

Les poids et les températures indiquées ici ont été pris tous les cinq jours.

Poids	Temps		Poids	Temps		Poids	Temps		Poids	Temps	
	Temps	Poids		Temps	Poids		Temps	Poids		Temps	Poids
368	41°7	345	42°	331	42°1	386	41°5	352	41°8		
360	41°9	340	42°1	325	42°3	382	41°5	358	41°7		
350	42°4	337	42°1	320	42°2	365	41°2	362	41°5		
360	41°9	336	41°9	330	41°5	360	41°	360	41°9		
362	42°	330	41°4	332	41°2	374	41°2	358	42°		
382	41°6	340	41°8	336	42°	380	41°5	362	42°3		
370	41°8	338	42°2	329	42°1	380	41°2	353	41°5		
382	41°9	345	42°1	338	42°2	375	41°6	355	41°3		
362	42°1	350	41°6	340	42°1	370	42°	348	41°2		
365	41°8	354	42°	336	42°8	372	42°1	360	41°5		
364	42°	350	41°5	345	42°1	375	42°2	355	42°5		
364	42°2	365	41°7	343	42°5	388	42°1	349	42°		
358	42°	372	41°5	348	42°3	394	42°2	355	42°		
352	41°6	365	42°2	342	41°7	398	42°1	362	42°1		
360	42°	368	42°	350	41°5	410	42°6	359	42°4		

Tableau II. — Dosage de la vitamine B₁ contenue dans V⁴K⁴ (méthode pré-ventive). — Les poids et les températures sont pris tous les jours ; dans les tableaux suivants nous les donnons seulement de 5 jours en 5 jours.

Régime + 0,04 gr. V ⁴ K ⁴		Régime + 0,045 gr. V ⁴ K ⁴		Régime + 0,05 gr. V ⁴ K ⁴		Régime + 0,055 gr. V ⁴ K ⁴		Régime + 0,06 gr. V ⁴ K ⁴	
Poids	Temps	Poids	Temps	Poids	Temps	Poids	Temps	Poids	Temps
352	42°	401	41°	386	42°6	376	41°2	372	42°6
356	41°6	380	41°2	368	42°1	373	41°5	358	42°5
340	41°5	382	41°4	372	42°6	362	41°	355	42°6
351	42°	388	41°3	376	41°6	382	41°3	364	42°1
355	41°5	378	41°5	375	41°3	379	41°3	368	41°9
353	41°5	373	41°2	382	41°8	386	41°1	358	41°9
357	41°3	381	41°3	390	41°9	396	41°3	370	42°3
358	41°5	389	41°2	390	41°3	398	41°8	374	42°1
362	41°2	387	41°4	379	40°9	390	42°	386	42°2
365	41°3	393	42°	397	41°2	391	41°6	386	42°1
370	41°5	399	41°5	386	42°	393	41°3	393	42°6
366	41°8	412	41°3	396	41°9	379	40°9	388	42°3
373	41°2	420	41°8	393	41°6	382	41°	392	41°2
372	41°2	409	41°5	401	41°3	388	41°6	396	41°6
365	41°4	406	41°2	384	41°9	403	41°3	391	42°

Tableau III. — Troisième lot de pigeons.

Dosage de la vitamine B₁ contenue dans le produit d'adsorption V⁴ K⁴

(méthode curative).

Poids	Temps	Poids	Temps	Poids	Temps
474	42°	455	42°6	434	42°2
462	42°4	424	42°5	397	42°4
445	41°6	410	42°2	370	41°
427	41°4	390	42°	352	40°8
430	41°3	355	41°3	335	41°3
435	40°	324	41°	328	crise 39°5
430	crise 37°2	307	crise 39°3	+ 0,035 V ⁴ K ⁴	
+ 0,035 Standard		+ 0,035 V ⁴ K ⁴		339	41°
380	40°	290	40°3	340	41°3
362	40°6	290	40°5	342	42°
352	41°1	297	39°5	340	42°
350	31°2	+ mort sans		337	41°8
359	41°5	nouvelle crise		344	42°5
342	40°8			338	41°6
+ mort sans				326	41°
nouvelle crise					

Poids	Temps	Poids	Temps	Poids	Temps	Poids	Temps
422	42°5	425	42°	375	42°8	380	42°5
369	42°6	400	42°5	345	42°6	340	42°2
359	42°	392	42°2	345	42°2	335	42°4
334	40°5	367	42°	335	42°	327	42°4
324	41°	337	crise 38°5	319	41°5	319	42°
307	41°3	+ 0,05 Stand		324	41°	314	41°6
302	40°2	334	41°3	325	crise 39°1	312	41°5
297	crise 38°2	347	42°7	+ 0,05 V ⁴ K ⁴		319	41°2
+ 0,05 Stand		355	43°3	319	41°4	395	crise 39°6
284	40°2	362	42°6	315	41°3	+ 0,05 V ⁴ K ⁴	
290	41°5	364	42°	320	42°	277	41°
290	41°3	365	41°5	330	41°5	275	41°1
292	41°2	374	42°5	337	41°4	274	41°5
294	41°3	372	42°6	342	40°7	275	41°5
		377	42°5	345	41°1	277	41°5
				352	41°5	296	41°7

Poids et températures prises tous les cinq jours.

3^e lot : 10 pigeons soumis au régime de M. Randoin sans vitamine B₁. Dès l'apparition des crises, on donnera à chacun des doses quotidiennes variables du produit V.K₁, soit 0,04 gr., 0,05 gr., 0,06 gr. afin de pouvoir délimiter avec précision la teneur du produit en vitamine B₁. (En comparant aux résultats obtenus avec le Standard). (Essais curatifs). (Tableau III).

Essais préventifs. — Nous avons utilisé 10 pigeons ; nous donnerons seulement les poids et les températures de 5 d'entre eux. Pour les autres nous donnerons seulement les résultats.

- 1 pigeon = régime artificiel + 0,04 de V.K₁
- 1 pigeon = régime artificiel + 0,045 de V.K₁
- 1 pigeon = régime artificiel + 0,05 de V.K₁
- 1 pigeon = régime artificiel + 0,055 de V.K₁
- 1 pigeon = régime artificiel + 0,06 de V.K₁

Pour les 5 autres pigeons qui ont été soumis à ce régime, nous avons eu des résultats comparables sauf pour celui soumis à 0,06 gr. V.K₁ qui est mort le 35^e jour, mort probablement due à une lésion de gavage. Nous ne donnons pas les courbes correspondantes qui sont à peu près des droites. Ces expériences nous montrent que 0,04 de V.K₁ contient une quantité d'unités de vitamine B₁ au moins égale à celles contenues dans 0,04 gr. de Standard International.

Dans le tableau précédent correspondant à la méthode curative nous avons éliminé une expérience faite avec le Standard à 0,07 (le pigeon est mort le jour de sa crise). D'autre part, nous n'avons pas mentionné les 2 expériences faites avec 0,06 gr. de Standard et 0,06 de V.K₁ (le pigeons ont survécu à leurs crises et sont redevenus normaux). Ces deux expériences ne prouvent rien puisque 0,05 gr. de V.K₁ suffit à guérir le pigeon de sa crise et lui permettre de se remettre.

En résumé, les expériences préventives nous montrent que 0,04 gr. de V.K₁ a la même activité que 0,04 gr. de Standard international ; on peut donc en déduire que 0,04 gr. de V.K₁ contient 4 U.I. de vitamine B₁, soit 100 U.I. pour 1 gr. de produit d'adsorption. Ces résultats sont confirmés par les expériences curatives. Nous pouvons donc conclure que notre produit d'adsorption V.K₁ (terre du Surrey à haut pouvoir adsorbant) a la même teneur en *aneurine* que le Standard international.

Les mêmes séries d'expériences ont été exécutées pour les adsorbats VK, V₁K₁, V₂K₂, V₃K₃, ainsi que pour l'aneurine cristallisée H.R. et I.G. Elles ont porté sur un ensemble de 125 pigeons environ. La brièveté de cet exposé ne nous permet pas de donner l'ensemble des protocoles expérimentaux, qui en outre seraient fastidieux. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Produit d'adsorption	VK.	55 U.I.	pour 1 gr. produit
—	—	V ₁ K ₁	32 U.I. — — —
—	—	V ₂ K ₂	98 U.I. — — —
—	—	V ₃ K ₃	75 U.I. — — —

Nous avons donné les chiffres concernant le titrage du produit d'adsorption V⁴K⁴ par le test-pigeon. (Essais préventif et curatifs). Pour les substances VK, V¹K¹, V²K², V³K³ nous donnerons seulement les tableaux résumant les essais curatifs. Les essais préventifs ont été faits avec chacune des substances citées. Ils concordent parfaitement avec les essais curatifs. On doit toutefois noter que ces derniers donnent un chiffre légèrement supérieur à celui donné par les premiers ; toutefois nous pouvons signaler qu'en aucun cas, l'écart n'a dépassé 8 %.

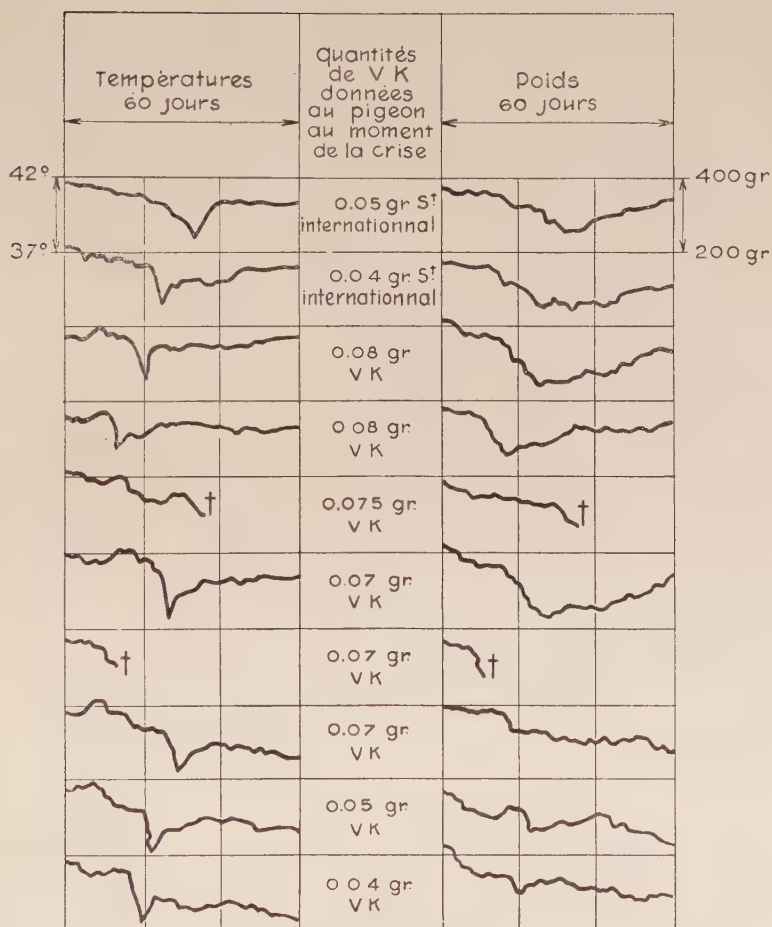


TABLEAU IV. — Essais curatifs avec VK.

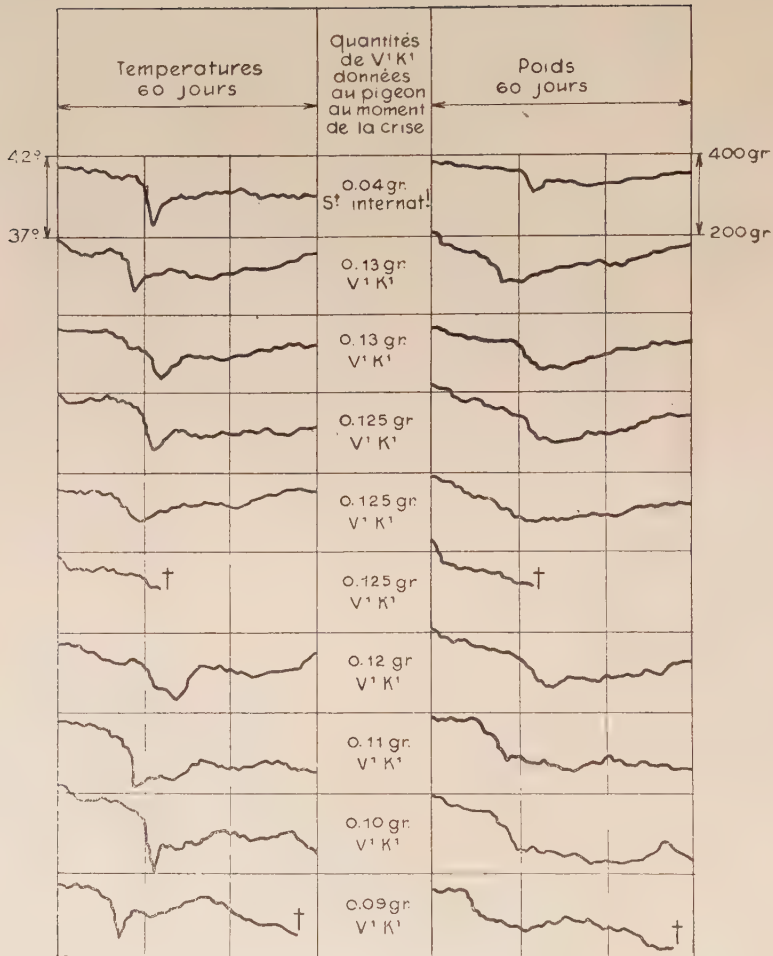


TABLEAU V. — Essais curatifs avec V₁K₁.

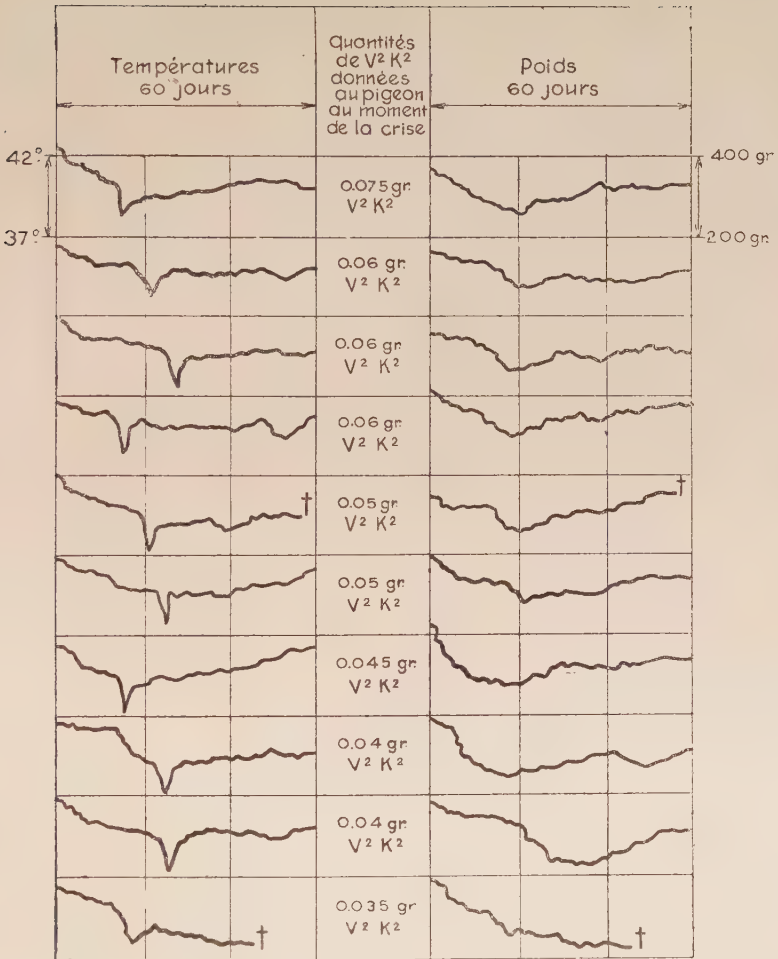


TABLEAU VI. — Essais curatifs avec V_2K_2 .

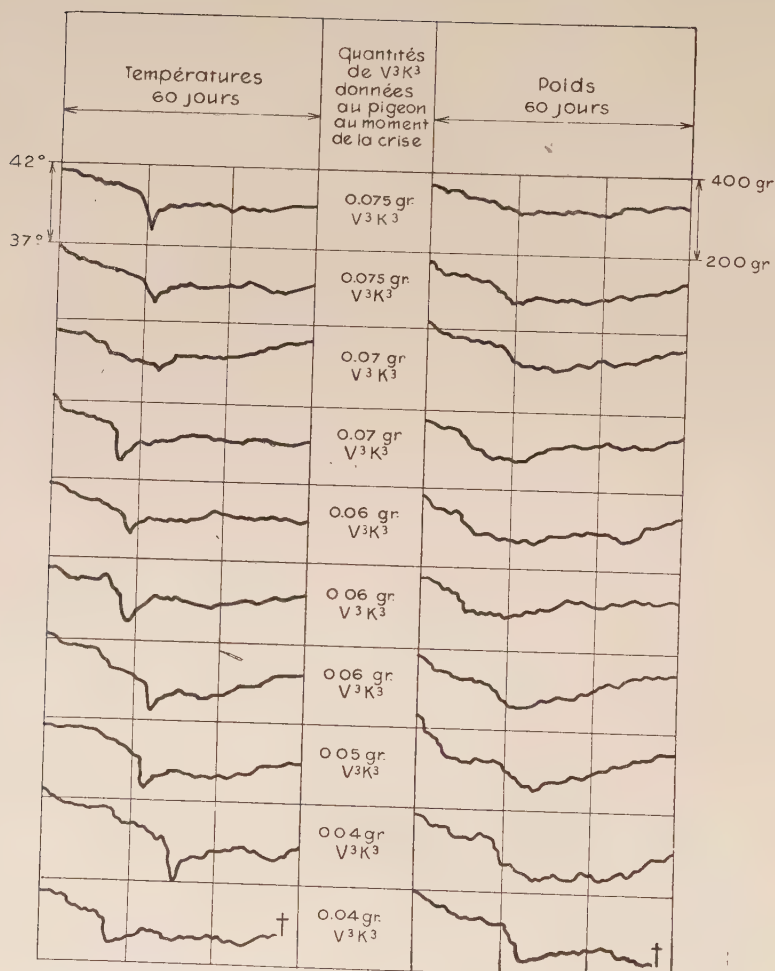


TABLEAU VII. — Essais curatifs avec V_3K_3 .

Test *Phycomyces* (W. H. Schopfer)

Nous avons titré les produits d'adsorptions VK, V¹K¹, V₂K₂, V₃K₃, V₄K₄ par le test *Phycomyces*. Nous avons à notre disposition une certaine quantité d'aneurine cristallisée.

Produits VK et V¹K¹

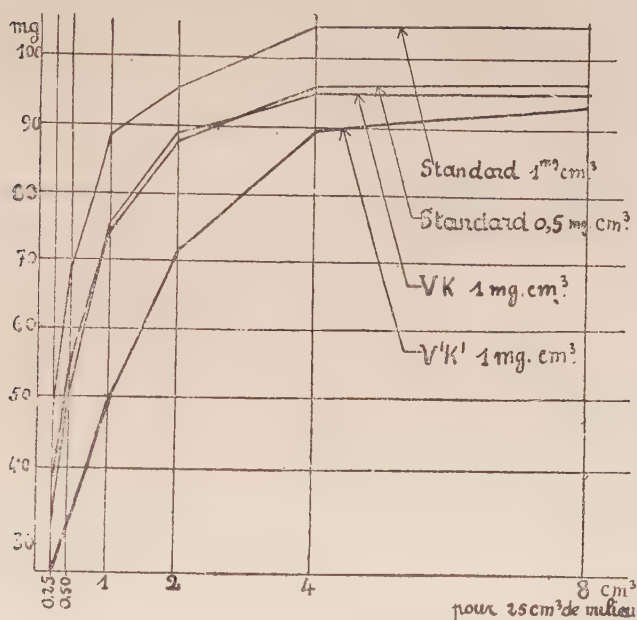


FIG. 12. — Courbes de titrages de la vitamine B₁ par des cultures de *Phycomyces*.

La figure nous montre que la courbe VK est très voisine de celle correspondant à celle de 0,5 mg de standard par cm³. On peut donc en conclure que 1 mg de produit VK a la même activité que 0,5 mg de Standard International ; donc 1 gr. de VK contiendra 50 U.I. de vitamine B.

L'examen de la courbe V¹K¹ nous montre que 2,7 cm³ de Standard à 0,5 mg par cm³ à la même activité que 4,2 cm³ de solution contenant 1 mg de V¹K¹ par cm³. On en déduit facilement que 1 gr. de V¹K¹ contient 36 U.I. de vitamine B.

De même, par les courbes suivantes, nous calculerons la teneur en aneurine des autres produits. Nous trouvons :

$$V_2K_2 = 90 \text{ U.I. gr.}$$

$$V_3K_3 = 83 \text{ U.I. gr.}$$

$$V_4K_4 = 96 \text{ U.I. gr.}$$

$$\text{Aneurine I.G.} = 380.000 \text{ U.I. gr.}$$

**Dosages de la vitamine B₁ contenue
dans les adsorbats V K, V¹ K¹, V² K²,
V³ K³, V⁴ K⁴
et le Standard International.**

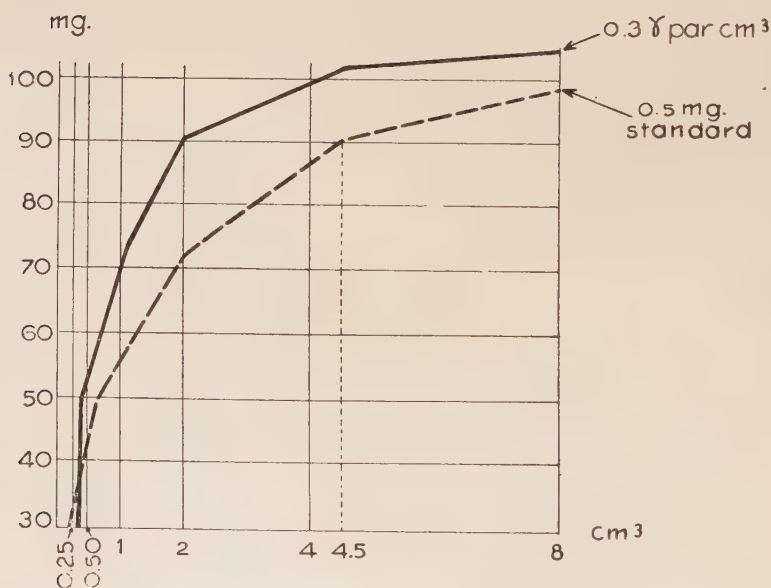


FIG. 13. — Evaluation de la teneur du Standard en aneurine par le *test-Phycomyces*.

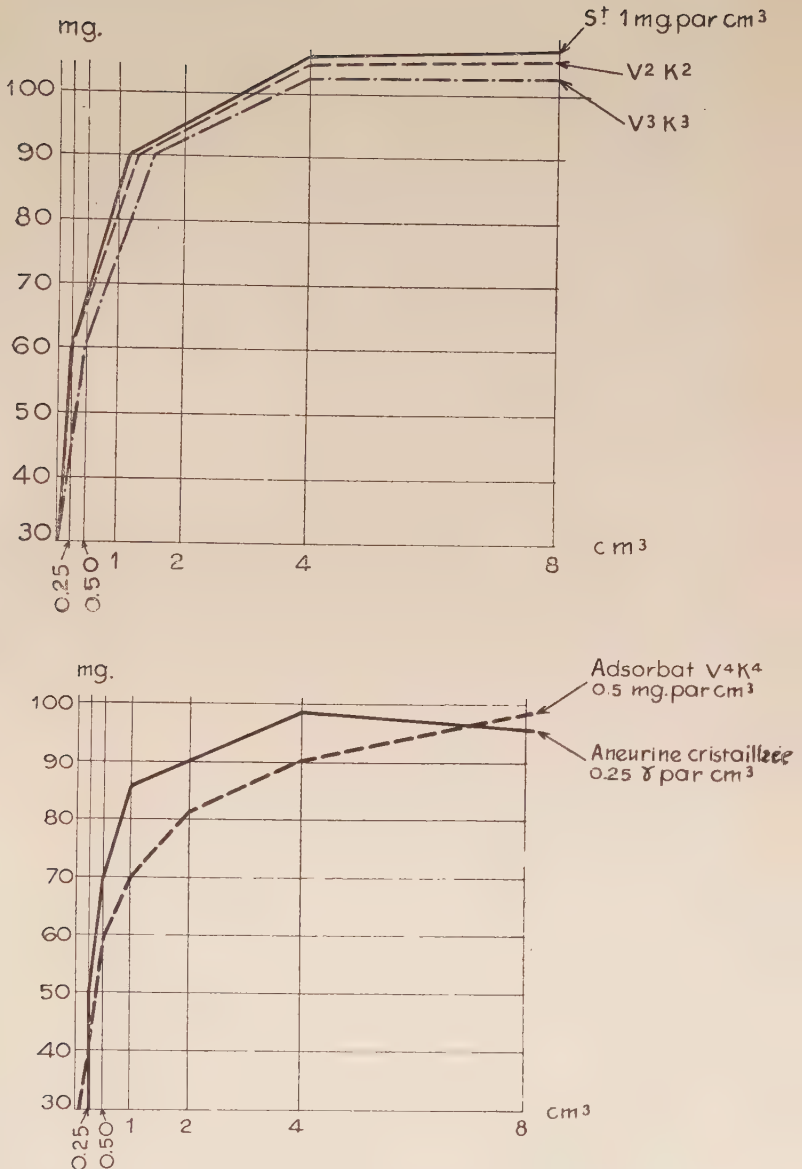


FIG. 14. — Courbes de croissance de *Phycomyces* correspondant aux produits V_2K_2 , V_3K_3 , V_4K_4 . Pour donner un exemple de détermination, considérons les courbes qui correspondent à V_4K_4 . Nous lisons que 2 cm³ de solution d'aneurine cristallisée contiennent la même quantité de vitamine B₁ que $4 \times 0,5 = 2$ mg d'adsorbat V_4K_4 .

Test-Rat

Nous avons employé le test décrit dans le chapitre précédent, test-rat modifié par le Professeur Dr. A. Scheunert. C'est sa technique que nous avons utilisée. Nous ne la décrivons pas de nouveau. Nous rappellerons seulement que nous avons recherché la dose de vitamine B₁ qui, sans avoir pour résultat une croissance notable maintient seulement les animaux à leur état de poids. Nous avons utilisé des jeunes rats en cours de développement (50 à 60 gr.). Nous leur avons soumis à l'alimentation préparatoire (1) exempte de vitamine B₁. Enfin, comme le Professeur Scheunert nous avons utilisé des groupes de 10 animaux.

Les dosages ont été effectués avec les produits suivants :

VK, V²K², V⁴K⁴ et la vitamine cristallisée I.G.

Nous avons fait des expériences comparatives entre les produits précédents et le Standard International.

Nous ne donnerons que les résultats obtenus sans donner les chiffres de dosages, chiffres qui seraient fastidieux. Voici donc nos résultats.

Produit étudié	Unités Internationales de Vitamine B ₁ par gramme du produit
VK	45
V ² K ²	80
V ⁴ K ⁴	85
Aneurine cristallisée I.G.	320.000

(1) Régime :

Caseine	168
Amidon	552
Sels	50
Palmine	70
Huile de foie de morue	80
Levure de bière sèche	80
autoclavée 5 heures.	

Tableau IV. — Résultats fournis par les test-pigeons, test-rats et test-phycomyces pour des produits d'adsorption de l'aneurine sur terre à foulon d'origines diverses et pour l'aneurine pure cristallisée.

PRODUIT A TITRES	Test-pigeon Unités Internationale au gr.	Test Rat U.I. au gr.	Test-Phycomyces ° U.I. au gr.
Produit d'absorption VK	55	45	50
Produit d'absorption V ¹ K ¹	32		36
Produit d'absorption V ² K ²	98	80	90
Produit d'absorption V ³ K ³	75		83
Produit d'absorption V ⁴ K ⁴	100	85	96
Vitamine cristallisée I.G.		320.000	380.000
Vitamine cristallisée H.R.			355.000

Conclusion

Après avoir indiqué la nature chimique, le rôle physiologique et la place qu'occupe la vitamine B₁, nous avons donné le principe des méthodes biologiques généralement utilisées pour le titrage de l'aneurine, les différents tests pigeons et rats, le test « bradycardie » le test « catatorulin », le test *phycomyces*. Ce dernier introduit par W. H. Schopfer a fait l'objet dans notre travail d'une étude plus détaillée puisqu'il est la base des expériences personnelles qui ont consisté dans l'étude comparative des test-*phycomyces* et des tests-pigeons et rats.

Nous avons préparé plusieurs produits d'adsorption à partir de levure de bière fraîche, de terre à foulon de différentes origines et nous avons titré ces différents produits par les tests pigeons rats et *phycomyces* ; enfin nous avons fait quelques déterminations pour l'aneurine cristallisée de provenances diverses.

Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau. Ils montrent une *concordance très satisfaisante* puisque les écarts maximum entre les différentes méthodes n'ont jamais atteints 20 % et le plus grand nombre d'entre eux étaient au-dessous de 10 %.

Nous faisons remarquer toutefois, que nous n'avons titré que des produits où les impuretés étaient peu importantes, puisque nous avons toujours utilisé dans ces titrages des substances telles que le Standard International, des adsorbats préparés de la même façon et enfin la vitamine B₁ cristallisée.

L'autoclavage rapide à 110° nécessité par cette méthode ne semble pas fausser le dosage, puisque les produits obtenus ainsi n'ont pas perdu leur action. Peut-être la molécule d'aneurine est-elle scindée et les produits de désintégration regroupés par *phycomyces* ? Nous l'ignorons, puisque ces produits de désintégration thermiques n'ont pas été encore isolés. W. H. Schopfer signale que ses expériences avec l'aneurine cristallisée ont d'ailleurs montré une thermostabilité de ce produit plus grande que celle admise généralement. De toute façon, cette désintégration, si elle existe, ne gêne pas les

titrages de produits purs avec *phycomyces* ; cela pourrait même devenir un avantage dans certaines circonstances.

Cette étude nous a permis de montrer que le test *phycomyces* présente dans les conditions expérimentales décrites (produits d'adsorption, vitamine pure) un grand intérêt. En effet, il permet des mesures simples et rapides (15 jours au maximum, au lieu de deux à trois mois pour les tests pigeons et rats). La quantité de substance vitaminée nécessaire au dosage est infime ; la sensibilité du test est extrêmement grande puisque une différence de $0,05 \gamma \text{ cm}^3$ se marque nettement dans l'allure de la courbe (W. H. Schopfer) ; enfin, chose non négligeable, cette méthode est d'un prix de revient à peu près nul, ce qui n'est pas le cas pour les autres qui nécessitent un matériel et un personnel important.

Le Président de Thèse

B. CUNEO

Vu : Le Doyen

TIFFENEAU

Vu et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris.

G. ROUSSY.

Bibliographie

- ABDEL SALAAM AND LEONG. — Measurement of synthesis of vitamin B¹ by bacteria, *Biochem. J.* 32, 958 (1938).
- AMMERMAN AND WATERMAN, 5. *Nutrition*, 10, 31 (1935).
- BIRCH AND HARRIS. — *Biochem. J.* 5. 28, 602 (1934).
- BIRCH AND HARRIS. — Comparison with other methods of assay, *Biochem. J.* 5. 28, 602 (1934).
- BAKER AND WRIGHT. — Survey of B¹ contents of large range of foodstuffs, *Biochem. J.* 5. 23, 1802 (1935).
- BAKER, WRIGHT AND DRUMMOND. — Comparison of various types of flours and breads, *Chem. Ind.* 56, 292 (1937) ; *J. Soc. Chem. Ind.* 56, 191 (1937).
- BAKER ET WRIGHT. — Détermination of vitamin B¹ in numerous foodstuffs; survey of accuracy of method after experience of 80.000 readings, *Biochem. P.* 5. 32, 2.156 (1938).
- CHICK (H.) AND RAE (M.), *Biochem. J.* 5. 23, 498 (1929).
- CARTER, KINNERSLEY AND PETERS. — *Biochem. J.* 5. 24, 1844. (1920).
- CAMARD, BURN, LING AND MORGAN. — *Biochem. J.* 5. 27, 1719 (1933).
- COWGILL. — *Vitamine B requirement of man* (Yale Univ. Press).
- FAGUET (M.). — Titration de la vitamine B₁ par un test végétal. Etude comparative avec le test-pigeon. — *C. R. Soc. Biol.* 126, p. 856, 1937.
- FISHER. — *Statistical methods*. (Edinburgh and London (1929).
- FARBEN (I. G.). — *Industrie Elberfeld*, Report to League of Nations Committee 1938.
- GUHA AND DRUMMOND. — *Biochem. J.* 5. 23, 880. (1929).
- HUNTER. — *Biochem. J.* 5. 16, 640 (1922). — *Biochem. J.* 5. 19, 25. (1925).
- HEYROTH. — *Biochem. J.* 5. 30, 645. (1936).
- HARRIS. — *Biochem. J.* 5. 31, 799 (1937).
- HARRIS. — Effect of manure on B¹ value of wheat and barley, 5. *agr. Sci.* 24, 410 (1934).
- HARRIS ET LEONG. — Measurement of vitamin. *Lancet* 1, 886 (1936).
- HARRIS, LEONG AND UNGLEY. — Vitamin B₁ in urine. *Lancet* 1, 539 (1938).
- HOFFMANN-LA-ROCHE. — *Bale*. Report to League of Nations Committee, 1938.
- JANSEN AND DONATH. — *Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam*, 29. 1390. (1926).
- KINNERSLEY AND PETERS. — *Biochem. J.* 5. 21, 789 (1927). — *Biochem. J.* 5. 22, 422. (1928).
- KINNERSLEY (H. W.), PETERS (R.A.). UND READER (V.A.). — *Biochem. J.* 5. 22, 276 (1928).
- KINNERSLEY AND PETERS. — *Biochem. J.* 5. 28, 667. (1934).
- KINNERSLEY AND PETERS. — *Biochem. J.* 5. 30, 985 (1936).
- KINNERSLEY AND PETERS. — *Biochem. J.* 5. 28, 667 (1934).
- KRIEGER (H.). — *Lassen, Acta Path. Microbiol Gand*, 13, 277 (1936).
- KARRER AND KUBLI. — For checking chemical method of assay *Helv. chim. Acta* 20, 369 (1937).
- KAESSLER AND HANKE. — *J. Biol. Chem.*, 39, 505. (1919).
- LEONG ET HARRIS. — *Biochem. J.* 5. 31, 812 (1937).

- LEONG ET HARRIS. — Standardisation of cristalline vitamin B¹. Biochem. J. 5. 31, 672 (1937).
- LEONG. — Study of métabolism of vitamin B¹ in rats, Biochem. J. 5, 31, 367. 373 (1937).
- LOHMANN. — Naturwissenschaften Jan. 8 th. (1937).
- LUNDE, KRING, STAD AND OBSER — Statistical study accuracy of method and comparison with thiochrome tests ; comprehensive surveys on numerous Normegian foodstuffs. Norsk Kidenskaps-Akad. Oslo, I. Mat. Naturv. Klasse No. 7. (1938).
- MEIKLEJOHN. — (In the Press).
- OHDAKE. — Bull. Agric. Chem. Soc. Japon, 8. 111 (1932).
- OHDAKE AND YAMAGASHI. — Bull. Agric. Chem. Soc. Japon, 11. 111. (1935).
- KINNERSLEY, O, BRIEN AND PETERS. — Biochem. J. 5. 29, 701. (1935).
- KINNERSLEY, O' BRIEN AND PETERS. — Biochem. J. 5. 27, 232. (1933).
- PASSMORE, PETERS AND SINCLAIR. — Biochem. J. 5. 27, 542 (1933).
- PETERS. — Chem. Brit. Assoc. 141 (Heffer) (1931).
- PASSMORE, PETERS AND SINCLAIR. — Biochem. J. 5. 27, 842 (1933).
- KINNERSLEY AND PETERS. — Biochem. J. 5. 28, 667 (1934).
- RANDOIN (Mme L.) et LE GALLIC (P.). — Nouvelle technique de dosage biologique de la vitamine B₁ avec le pigeon adulte C.R. Soc. Biol. 128, p. 1.052, 1938.
- RANDOIN (Mme L.) et LE GALLIC (P.). — Nouvelle technique de dosage biologique de la vitamine B₁ avec le jeune rat. — C.R. Soc. Biol. 128, p. 1.055, 1938.
- PEDERSEN. — For comparison of biological and chemical methods, Dansk, Tidsskr, Farm, 12, 137 (1938).
- PYKE. — Nature, Lond, 141, 1141 (1938).
- SHEUNERT (A.) UND SCHIEBLICH (M.). — Klin. Wochschr, 8, I, 699 (1929).
- SHEUNERT (A.) UND SCHIBLICH. — Biochem. Z. 209, 290 (1929).
- SCHIEBLICH (M.). — Biochem. Z. 230, 312 (1931).
- SHEUNERT (A.) UND SCHIEBLICH (M.). — Biochem Z. 263. 444 (1933).
- SCHIEBLICH (M.). — Biochem, Z. 265. I. (1933).
- SCHOPFER (W. H.). — Bull. soc. bot. suisse 1931, t. 40, p. 87 ; 1932, t. 41, p. 73, C. R. Soc. phy. hist. nat. Genève, 1932, t. 48, p. 105. Arch. Mikrobiol., 1934, t. 5, p. 511. C.R. de l'Acad. des Sc., 1935, t. 200, p. 1965, t. 17, Vitaminforsch., 1935, t. 4, p. 67. Bull. de la Soc. Chim. biol., 1935, t. 17, p. 1097. W.H. Schopfer et Jung. C.R. de la Soc. phy. hist. nat. Genève, 1936, t. 53, p. 22. W.-H. Schopfer. V. Congr. inter. Scheveningue, 1937, p. 22.
- TODD AND BERGEL. — Testing synthétic vitamin B¹ and analogues, 5. Chem. Soc., p. 364 (1937).
- TSCHESCHE, RUHKOFF, LAQUEUR AND SCHULTZ. — Nachricht. Ges. Wissenschaften Gott. 207 (1931).
- WILLIAMS, WATERMAN, AND KERESZTESY. 5. Amer. Chem. Soc. 56, 1187 (1934).
- WEISS, HAYNES AND ZELL. — Specificity of the brady-cardia and distinction from the effects of inanition, etc... Amer Heart, 5. 15, 306 (1938).

Table des Matières

	Pages
I. — Introduction. Le Groupe des Vitamines B (B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₄ , B ₆ , P)	11
II. — La vitamine B ¹ (Aneurine)	13
1° Historique.	
2° Propriétés physiologiques.	
3° Propriétés chimiques.	
III. — Les méthodes biologiques de titrage de l'aneurine	19
1° Le test « Bradycardie ».	
2° Le test « Catatorulin ».	
3° Les tests pigeons et rats.	
4° Le test- <i>phycomyces</i> .	
IV. — Le test- <i>phycomyces</i> : description détaillée de la méthode	31
V. — Recherches personnelles comparatives sur les valeurs des tests, rats, pigeons et <i>phycomyces</i> ..	37
VI. — Conclusions	55
VII. — Bibliographie	57

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

AMELINE ... Pathologie chirurgicale.
 BARIETY ... Pathologie médicale.
 BENARD (Henri). Pathologie médicale.
 BERNARD Etienne. Pathologie médicale.
 BESANÇON (Justin). Hydrologie.
 BOULIN ... Pathologie médicale.
 BULLIARD ... Histologie.
 CATHALA ... Pathologie médicale.
 CHEVALLIER. Pathologie médicale.
 COSTE ... Pathologie médicale.
 DOGNON ... Physique.
 FEY ... Urologie.
 FUNCK ... Pathologie chirurgicale.
 GALLIARD ... Parasitologie.
 GASTINEL ... Bactériologie.
 DE GAUDART D'ALLAINES. Pathologie Chirurgicale.
 GAYET ... Physiologie.
 DE GENNES ... Pathologie médicale.
 GIROUD ... Histologie.
 HAGUENAU ... Pathologie médicale.
 HALPHEN ... Oto-rhino-laryngologie.
 HUGUENIN ... Anatomie pathologique.
 JOANNON ... Hygiène.
 LACOMME ... Obstétrique.

MM.

LANTUEJOUL Obstétrique.
 LAROCHE (Guy) Pathologie médicale.
 LAVIER ... Parasitologie.
 LELONG ... Pathologie médicale.
 LEMAIRE ... Pathologie expérimentale.
 LEVEUF ... Pathologie chirurgicale.
 Mlle J. LEVY. Pharmacologie.
 LEVY-VALENSI. Neurologie et Psychiatrie.
 MENEGAUX ... Pathologie chirurgicale.
 MOLLARET ... Pathologie médicale.
 MOREAU ... Pathologie médicale.
 MOULONGUET. Pathologie chirurgicale.
 MOUQUIN ... Pathologie médicale.
 PETIT-DUTAILLIS ... Pathologie chirurgicale.
 PIEDELIEVRE Médecine légale.
 PORTES ... Obstétrique.
 RENARD ... Ophtalmologie.
 RICHET ... Physiologie.
 SENEQUE ... Pathologie chirurgicale.
 TURPIN ... Pathologie médicale.
 VIGNES ... Obstétrique.
 WILMOTH ... Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.

ALGLAVE ... Pathologie chirurgicale
 BUSQUET ... Pharmacologie.
 CHAILLEY-BERT. Physiologie.
 GUENIOT ... Obstétrique.
 HEITZ-BOYER. Pathologie chirurgicale

MM.

LARDENNOIS. Pathologie chirurgicale
 LE LORIER ... Obstétrique.
 NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie.
 SCHWARTZ... Pathologie chirurgicale.
 VAUDESCAL. Obstétrique.

IV. — AGREGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
à titre permanent

MM.		MM.	
ALAJOUANINE	Clinique médicale.	BASSET	Clinique chirurgicale
AUBERTIN		BROCO	
BRULE		CADENAT	
CHABROL		GATELLIER ..	
DONZELOT		MOURE	
DUVOIR		QUENU	
LIAN		VELTER	
PASTEUR VALLERY- RADOT			
SEZARY			

MM.	
EGALLE	Clinique obstétricale
METZGER ...	

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé.	Education physique.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
RUPPE	Stomatologie.
WEIL-HALLE	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans des dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.